

Desarrollo e implementación de una metodología simple para cuantificar el potencial microbiológico de contaminación en laboratorios de investigación y docencia

Development and Implementation of a Simple Method for Quantify Potential Microbial Contamination in Teaching and Research Laboratory Spaces

Luis Alexis Jiménez-Barboza¹
Universidad de Costa Rica, Sede de Occidente, Costa Rica.
luis.jimenezbarboza@ucr.ac.cr

Alina M. Gamboa-Villalobos²
Universidad de Costa Rica, Sede de Occidente, Costa Rica
alinagamboa02@gmail.com

Fecha de recepción: 14-10-22

Fecha de aceptación: 20-11-22

Resumen

En este artículo se ha desarrollado e implementado un método basado en muestreos ambientales pasivos mediante sedimentación en placa Petri, con el fin de cuantificar fácilmente la contaminación microbiana en diferentes áreas del Laboratorio de Biotecnología de la Sede de Occidente, Universidad de Costa Rica. La metodología permite determinar el potencial de contaminación de distintas zonas mediante el Conteo de Unidades Formadoras de colonias biológicas (CFU), las cuales se forman en las placas Petri luego de haber sido abiertas por un tiempo definido en cada espacio y luego de una etapa de incubación determinada. Las condiciones optimizadas en este estudio dieron como resultado un tiempo de apertura de placa de 2 h, seguido por un período de incubación de 48 h a 37 °C. En cuanto al potencial de contaminación, se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre los 6 espacios de laboratorio estudiados, al emplear 3 repeticiones de placa Petri por área durante 5 muestreos semanales de monitoreo ambiental. La zona más contaminada resultó ser el área de lavado y autoclave, seguida por la mayoría de las áreas principales de trabajo para estudiantes e investigadores y de preparación de cristalería. La zona que presentó la menor generación de CFU fue la correspondiente a la preparación de reactivos y uso de equipos de laboratorio. Este método se puede adaptar de forma sencilla a otros laboratorios de docencia e investigación que requieran inspeccionar el potencial de contaminación que poseen diferentes espacios de trabajo, ajustando la etapa de apertura de placa y de incubación para una generación adecuada de CFU. Este es el primer protocolo de monitoreo ambiental microbiológico desarrollado en el Laboratorio de Biotecnología de la Sede de Occidente de la Universidad de Costa Rica.

Palabras clave: Unidades formadoras de colonia, UFC, CFU, microbiología, muestreo ambiental pasivo, esterilidad, medio de cultivo, laboratorio, metodología.

1 M.Sc. en Biotecnología. Departamento de Ciencias Naturales de la Universidad de Costa Rica, Sede de Occidente.

2 Bach. Laboratorista Químico. Universidad de Costa Rica, Sede de Occidente, Costa Rica.

Abstract

In this article it has been developed and implemented an environmental air monitoring-based method to easily quantify microbial contamination in different areas of the *Laboratorio de Biotecnología*, at the *Occidente Campus of Universidad de Costa Rica*. It determines potentially polluted zones by counting the viable fallout onto Petri dishes left open that, after incubation, give rise to microbial colony forming units (CFU). The optimized conditions for this study resulted in a Petri dish opening time of 2 h followed by an incubation period of 48 h at 37 °C. This method can be simply adapted to other teaching and research laboratories by segmenting the main working spaces into different areas (depending on the nature and activities they present) and adjusting the Petri dish opening time and incubation conditions to allow proper CFU formation. It has been found statistically significant differences among the 6 studied laboratory spaces by using 3 Petri dishes replicates per area during 5 sampling weeks of environmental monitoring rounds. The most polluted area resulted to be the washing and autoclaving area; followed by most of the laboratory working benches. The least contaminated area comprised the one destined to the preparation of reagents and use of laboratory equipment. This is the first microbial environmental monitoring protocol ever developed at the *Laboratorio de Biotecnología at Occidente Campus of Universidad de Costa Rica*. It will facilitate a better use, distribution, and maintenance of clean areas within the laboratory to implement more complex and specialized methodologies that demand better microbiological conditions in the near future.

Keywords: Colony Forming Unit, CFU, Microbiology, Microbial Environmental Monitoring, Methodology, Culture Media, Sterility, Laboratory.

I. Introducción

Uno de los principales retos que enfrentan gran cantidad de laboratorios enfocados en la aplicación y mejoramiento de procesos de calidad es la contaminación microbiológica (Bykowski y Stevenson, 2020; Dennis, Owora y Kirkpatrick, 2015; Lavelle, 2020; Sanders, 2012a y 2012b; Suvikas-Peltonen et al., 2017). Los laboratorios de Biotecnología y Microbiología son especialmente afectados por la contaminación del entorno (Aguilar-Cascante, 2000; Genzen, 2020; Leifert, Morris y Wates, 1994), ya que implementan metodologías en donde mantener condiciones asépticas es fundamental para la generación de datos confiables (Leifert et al., 1994). Esto incluye también laboratorios destinados a la docencia e investigación (Romero-Bohórquez, Castañeda y Acosta, 2016). Por lo anterior, es recomendable que cualquier tipo de laboratorio posea controles periódicos que aseguren la limpieza y estado óptimo de los lugares de trabajo (Ezzelle et al., 2008; Genzen, 2020; Stevens, 2003).

En aquellos laboratorios donde es fundamental el aseguramiento de las condiciones asépticas en distintas áreas de trabajo se vuelve imperativo desarrollar métodos de control y detección del potencial de contaminación de cada zona de trabajo (Ashour, Mansy y Eisha, 2011; Leifert y Woodward, 1998); esto es determinar las regiones o zonas más limpias y las más propensas a presentar partículas asociadas a bacterias, polen, hongos, entre otros. Lo anterior permite reducir la exposición de materiales y muestras a los contaminantes, sus fuentes, además de estandarizar condiciones de trabajo que aseguren los mejores resultados asépticos (Gordon, Staerk y Roesti, 2014; Stärk, 2020).

1.1 Definición del potencial de contaminación

Para la implementación de técnicas biotecnológicas avanzadas (como el cultivo *in-vitro* de tejidos) es necesario, en primera instancia, conocer el ambiente de trabajo (Mroginski y Roca, 1991). Una forma de determinar esto es mediante la cuantificación de la carga microbiana del aire en las zonas de interés,

lo cual se puede determinar mediante monitoreos ambientales. El objetivo de estos ensayos consiste en determinar las condiciones microbiológicas de una o varias zonas de interés (Pérez y Sánchez, 2010). En estudios microbiológicos, una manera rápida, sencilla y de bajo costo para analizar y cuantificar el potencial o grado de contaminación de distintas áreas se basa en el conteo de Unidades Formadoras de Colonias biológicas (CFU por sus siglas en inglés), las cuales crecen en contenedores que poseen medio de cultivo nutritivo para una amplia gama de microorganismos (Sieuwerts et al., 2008).

1.2 Métodos para cuantificar el potencial de contaminación por microorganismos

En Italia Pasquarella, Pitzurra y Savino (2000) estandarizaron muestreos de aire por métodos pasivos (sedimentación en placas) para la medición de la contaminación microbiana del ambiente en diversos entornos. Basados en lo anterior, establecieron un Índice de Contaminación Microbiana del Aire (IMA), que permite caracterizar y cuantificar el potencial de contaminación que produce el aire de cada área estudiada. Con la ventaja de ser un método barato, se puede aplicar en condiciones estériles, pues permite la toma de muestras simultáneamente y además, aporta resultados confiables y comparables.

Por otro lado, Romero-Bohórquez et al. (2016) realizaron un monitoreo de la calidad del aire mediante una metodología de muestreo pasivo de sedimentación por placa para determinar la calidad microbiana del aire en un laboratorio universitario. El estudio permitió la caracterización y clasificación del riesgo microbiológico del laboratorio y apuntó la necesidad de implementar medidas de desinfección y ventilación con el fin de disminuir la carga microbiana en el aire.

1.3 Laboratorio de Biotecnología de la Sede de Occidente de la Universidad de Costa Rica

Este estudio representa el primer análisis de monitorio ambiental microbiológico realizado en la Sede de Occidente de la Universidad de Costa Rica, con el fin de determinar las zonas específicas del Laboratorio de Biotecnología más adecuadas para aplicar metodologías avanzadas (tanto de docencia como de investigación) que requieren un manejo óptimo de la técnica aséptica, incluyendo técnicas en el campo de la Biología molecular, Microbiología, y cultivo *in-vitro* de tejidos vegetales. Además, la metodología y análisis de resultados mostrados en este artículo permite determinar y establecer, de forma general, el potencial de contaminación microbiológico de distintas áreas clave de un laboratorio de manera rápida y accesible con el fin de establecer las condiciones óptimas de trabajo.

II. Fundamentación metodológica

El método desarrollado en este estudio utilizó un muestreo ambiental pasivo mediante sedimentación en placa Petri, para el cual se seleccionó tiempo de muestreo, tiempo de incubación y temperatura de incubación como variables de control, según las pautas establecidas en el método del IMA (Pasquarella et al., 2000) con modificaciones basadas en Pérez y Sánchez (2010) con respecto a los tiempos de muestreo.

2.1 Lugar de estudio

El estudio se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Sede de Occidente, ubicado en el Recinto de Grecia de la Universidad de Costa Rica durante el segundo semestre del 2021. Dicho laboratorio posee un área aproximada de 63 m² (9 x 7 m), con una capacidad para 10 estudiantes, y cuenta con una entrada principal y una salida de emergencia. Además, posee un cuarto de lavado y autoclave de utensilios de laboratorio, así como un área independiente para trabajo con electroforesis

y biología molecular, ambas separadas del resto de las áreas de trabajo del laboratorio; asimismo, cuenta con 2 flujos laminares (uno para trabajo microbiológico y otro para cultivo *in-vitro* vegetal). Se destaca el uso del Laboratorio de Biotecnología de la Sede de Occidente no solo para investigación, sino también para docencia en cursos de bachillerato como B0303 Laboratorio de Introducción a la Genética Humana, MB2000 Fundamentos de Microbiología para Laboratoristas Químicos y RP2100 Fundamentos de Técnicas Biotecnológicas, y cursos de licenciatura como LQ0019 Laboratorio de Instrumentación y Técnicas Biotecnológicas, así como para cursos de posgrado como SP6611 Variación Genética y Conservación.

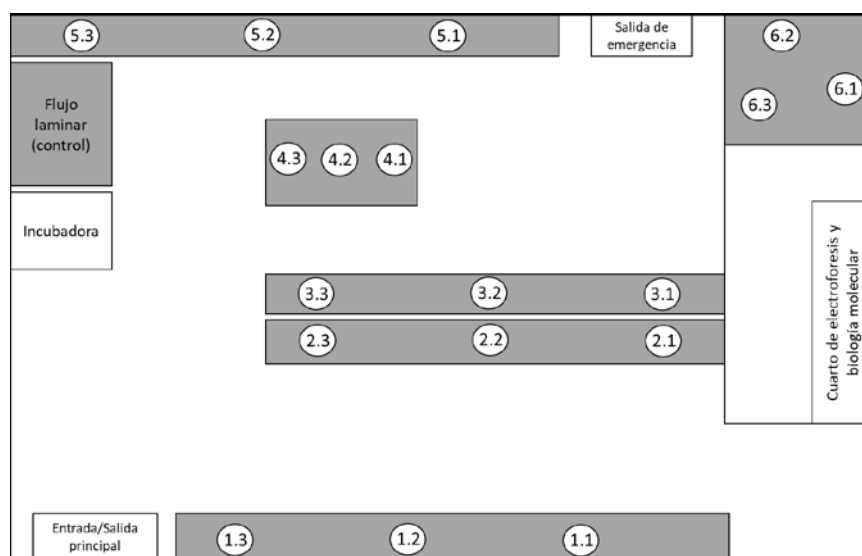
2.2 Consideraciones para la división de las áreas de estudio

Uno de los primeros pasos para realizar un monitoreo ambiental es distribuir el espacio físico a estudiar en zonas de muestreo, tomando en

cuenta su función, características o naturaleza de las actividades comúnmente realizadas en cada una. Para este estudio, el Laboratorio de Biotecnología de la Sede de Occidente se dividió en 6 áreas. El área 1 se destina a la preparación de reactivos y uso de equipos de laboratorio (como balanzas, centrifugas, calentadores, pH-metro, entre otros); las áreas 2, 3 y 5 son zonas de trabajo para investigadores y estudiantes; el área 4 se utiliza como superficie para la colocación, manipulación y preparación de útiles de laboratorio, y el área 6 corresponde al área de autoclave, lavado y secado de materiales del laboratorio. La Figura 1 ilustra la distribución realizada para los muestreos ambientales microbiológicos efectuados mediante la presente metodología.

Figura 1

Croquis (no a escala) de la distribución de las áreas del Laboratorio de Biotecnología de la Sede de Occidente de la Universidad de Costa Rica para el muestreo ambiental pasivo mediante sedimentación en placa Petri



En color gris se muestran las 6 áreas seleccionadas para cada muestreo microbiológico (1= área de equipos; 2, 3 y 5= áreas de trabajo; 4= área de preparación de cristalería; 6= área de lavado), incluyendo un área control que corresponde al flujo laminar donde se trabaja en condiciones asépticas. En cada muestreo, cada zona contó con 3 réplicas independientes (placas Petri con medio de cultivo general Agar Nutritivo Difco™) posicionadas según se ilustra en la figura (excepto en el área control donde las 3 placas Petri se dispusieron de manera aleatoria).

2.3 Preparación de material y medio de cultivo

Se utilizó Agar Nutritivo marca Difco™ como medio de cultivo general, a una concentración de 23 g/L utilizando agua destilada. Para su preparación, el medio se calentó en una plantilla térmica hasta su ebullición, donde se dejó hervir por 1 minuto. Finalmente, el medio fue transferido a una botella de vidrio para su autoclave. Toda la cristalería y materiales de laboratorio, así como los medios de cultivo, se esterilizaron en una autoclave tipo cilindro durante 20 min a 121 °C y a una presión de 15 psi.

Se utilizaron placas Petri de vidrio borosilicato de 9.5 cm de diámetro. Una vez esterilizadas, se procedió al llenado de cada una con alrededor de 25 ml de medio de cultivo en condiciones asépticas en el flujo laminar. Para evitar un exceso de condensación en las placas recién preparadas, estas se dejaron parcialmente abiertas dentro del flujo laminar hasta la solidificación del medio.

2.4 Muestreos ambientales pasivos mediante sedimentación en placa Petri

Se realizaron muestreos semanales. Una vez preparadas las placas Petri estériles con medio de cultivo general, se colocaron 3 de ellas por cada área de interés del laboratorio (ver Figura 1). Para su disposición, es importante mantener el orden

de cada placa (réplica), así como una distancia aproximadamente similar entre ellas en cada zona para cada muestreo. Una vez colocadas, las placas se abren por un periodo de tiempo definido (en este caso, 1 h y 2 h). Finalizado el tiempo, se cierran y se sellan con plástico adhesivo para ser mantenidas en una incubadora a 37 °C por 48 o 96 horas. Una vez determinado el periodo de apertura idóneo de las placas, así como el tiempo de incubación más adecuado (según las condiciones específicas del laboratorio), se realizaron un total de 5 muestreos semanales con el fin evaluar las condiciones microbiológicas de las 6 áreas de interés del Laboratorio de Biotecnología de la Sede de Occidente.

2.5 Conteo de unidades formadoras de colonias (CFU)

Como variable respuesta, para evaluar los resultados de la aplicación de este protocolo, se utilizaron las unidades formadoras de colonias (CFU) obtenidas en cada placa Petri después del periodo de incubación. Esta es una variable frecuentemente en los estudios microbiológicos para el recuento de microorganismos y que, en este estudio, representa el potencial de contaminación que posee cada área del laboratorio evaluada. El conteo de CFU se realizó utilizando un contador de colonias que posee una luz fluorescente que facilita el proceso.

2.6 Análisis de los datos

El análisis de resultados utilizando este protocolo se realizó mediante el programa estadístico abierto R ("R Project for Statistical Computing: a Language and Environment for Statistical Computing", <https://www.R-project.org/>).

Para verificar el efecto del área de laboratorio sobre la variable respuesta (CFU) durante los muestreos, se utilizó un modelo generalizado lineal basado en la distribución de Poisson. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) utilizando un nivel de significancia de 0.05 con el fin de

detectar diferencias significativas en el potencial de contaminación microbiológica entre las áreas de laboratorio de interés (ver Figura 1). En caso de obtener diferencias significativas, se implementó una prueba *post-hoc* de Tukey HSD con el fin de determinar cuáles áreas son significativamente distintas entre sí (Pair-Wise Comparison Test) en cuanto a su capacidad de generar CFU.

III. Resultados y discusión

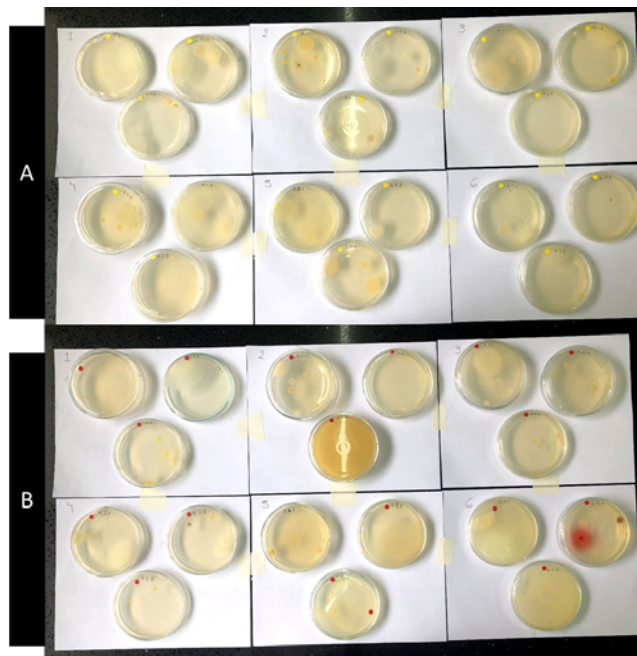
3.1 Establecimiento del protocolo para cuantificar el potencial microbiológico de contaminación

Se logró establecer un protocolo de monitoreo ambiental adaptado a las condiciones del Laboratorio de Biotecnología de la Sede de Occidente de la

Universidad de Costa Rica. La Figura 2 ilustra el resultado típico de uno de los muestreos semanales realizados utilizando los intervalos de tiempo de apertura seleccionados (1 h y 2 h). Se determinó que el tiempo de apertura idóneo de las placas bajo las condiciones específicas del laboratorio fue de 2 h.

Figura 2

Crecimiento de CFU en 6 áreas específicas del Laboratorio de Biotecnología de la Sede de Occidente de la Universidad de Costa Rica, utilizando distintos tiempos de apertura de placa durante los muestreos ambientales pasivos



A) Muestreo con apertura de placa de 1 h. B) Muestreo con apertura de placa de 2 h. Todas las placas contienen agar nutritivo marca Difco™ como medio de cultivo general, a una concentración de 23 g/L.

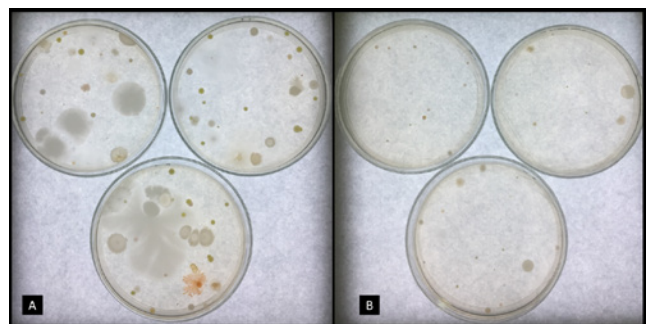
En cuanto a las condiciones de incubación de las placas Petri, la Figura 3 muestra el comportamiento general de 3 réplicas en cuanto a la producción de las CFU luego de los 2 periodos de crecimiento examinados en este estudio. Se determina que, luego del proceso de muestreo, la temperatura y tiempo de incubación aptos es de 37 °C por 48 h (2 días). Periodos de incubación mayores a dos días no permitían un conteo adecuado de las colonias discretas porque se daba un crecimiento excesivo de estas (ver Figura 3). Se sabe que, cuando los microorganismos se encuentran bajo condiciones ambientales favorables de humedad y temperatura, así como en un medio adecuado que brinda los nutrientes necesarios, se favorece su crecimiento y proliferación (Junco y Rodríguez, 2001) proporcionándoles las condiciones ambientales adecuadas. Los microorganismos en fase de crecimiento realizan réplicas de sí mismos y requiriendo los elementos que se encuentran en su composición química. Se le deben brindar los elementos nutritivos en una forma accesible desde el punto de vista metabólico. Además, los microorganismos requieren energía metabólica con el objetivo de sintetizar macromoléculas y conservar los gradientes químicos esenciales a través de sus membranas. Durante el crecimiento se deben regular los factores nutricionales (carbono, nitrógeno, azufre y fósforo, elementos trazas y vitaminas, por lo que, luego de 96 h de incubación, se evidenció un crecimiento excesivo de las colonias. Además, se considera que una temperatura de incubación de 37 °C es adecuada por varios aspectos.

Primero, esta temperatura se encuentra dentro del rango de crecimiento general de una amplia gama de microorganismos ubicuos en el ambiente (como bacterias, hongos, levaduras) (Flores-Rubio, 2018; Forbes Sahm y Weissfeld, 2009), lo cual favorece la proliferación de un amplio espectro de estos que

fueron captados durante el muestreo de las áreas. Segundo, la temperatura de 37 °C es estratégica debido a la naturaleza de las actividades docentes y de investigación realizadas en el Laboratorio de Biotecnología de la Sede de Occidente de la Universidad de Costa Rica, donde se utilizan frecuentemente ensayos y pruebas microbiológicas a esta misma temperatura; por ejemplo, el crecimiento de cepas bacterianas del género *Vibrio* se incuban a 37 °C (Briceño et al., 2009). La selección de esta temperatura en el presente protocolo de monitoreo ambiental complementa y ayuda en el quehacer docente e investigativo del sitio de estudio, ya que permite la detección de microorganismos presentes en las metodologías de trabajo realizadas usualmente en el laboratorio.

Figura 3

Crecimiento de CFU luego de los muestreos ambientales pasivos mediante sedimentación en placa Petri realizados en el Laboratorio de Biotecnología de la Sede de Occidente de la Universidad de Costa Rica, utilizando distintos tiempos de incubación a 37 °C



A) Durante un tiempo de incubación de 96 h. B) Durante un tiempo de incubación de 48 h. Todas las placas contienen agar nutritivo marca Difco™ como medio de cultivo general, a una concentración de 23 g/L.

Como lo muestran la Figura 2 y Figura 3, se puede apreciar que las condiciones idóneas para la aplicación de este protocolo de monitoreo ambiental pasivo mediante sedimentación en placa Petri es utilizar un tiempo de apertura de placa de 2 h durante los muestreos microbiológicos y un periodo de incubación a 37 °C por 48 h, según las condiciones experimentales presentes en el Laboratorio de Biotecnología de la Sede de Occidente de la Universidad de Costa Rica. Lo anterior, debido a que la cantidad de CFU desarrolladas en las placas, es fácilmente cuantificable; además, no existe traslape significativo entre colonias que puedan sobreestimar o subestimar el número total de CFU por placa. Este es un indicativo importante de que el tiempo de apertura y las condiciones de incubación determinadas son las adecuadas (Shiferaw et al., 2016; Solano Barquero, Chacón, Barrantes, y Achí, 2013).

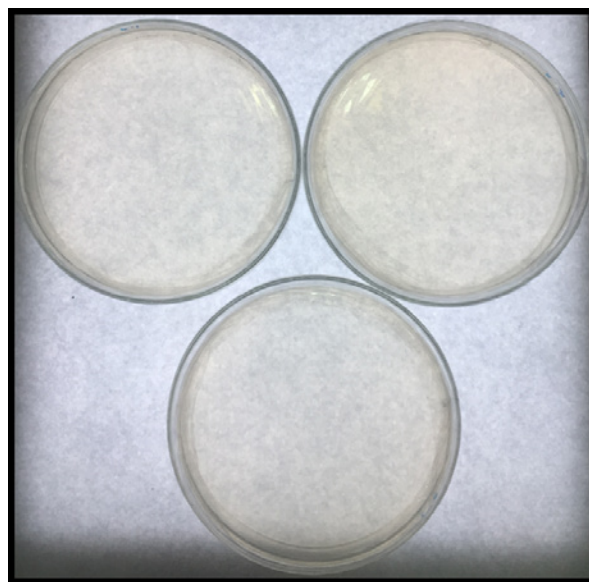
Para la aplicación de cualquier protocolo de monitoreo microbiológico ambiental pasivo en laboratorios, es imperativo optimizar y definir las variables de tiempo de apertura de las placas, así como temperatura y duración del proceso de incubación de estas (Rojas, 2017). Encontrar un balance entre el tiempo de incubación y la duración del muestreo microbiológico es fundamental para obtener una cantidad adecuada de CFU representativo del lugar de estudio. Esto solo puede ser determinado experimentalmente e incluso puede variar con respecto al uso y actividades que se desarrollan en un laboratorio a lo largo del tiempo. Por lo anterior, en algunas ocasiones podría ser necesario ajustar estos parámetros cuando la cantidad de CFU por placa resulta ser poco óptima para su debido conteo e identificación (Gordon et al., 2014; Shiferaw et al., 2016) a 90mm diameter Petri-plate containing Sheep Blood agar (Oxoid, UK).

Es importante recalcar que, todos los muestreos ambientales pasivos mediante sedimentación en placa Petri realizados semanalmente contaron con placas control (3 réplicas), las cuales también se abrieron durante el mismo periodo de tiempo

que el resto de placas, pero en un área aséptica (flujo laminar del laboratorio, ver Figura 1). Estas se consideran placas control debido a que no se espera que presenten ningún desarrollo de CFU, lo cual valida tanto los procedimientos de esterilización, como las técnicas aplicadas para la preparación y manipulación de las placas y respalda la confiabilidad de los datos generados en las pruebas de esterilidad (Romero-Bohórquez et al., 2016). La Figura 4 muestra el resultado obtenido de manera consistente en las placas control, las cuales no presentaron ninguna señal de contaminación debido a la ausencia total de CFU luego del periodo de incubación. De este modo, se valida los muestreos ambientales pasivos mediante sedimentación en placa Petri realizados cada semana y expone que la única fuente de contaminación biológica presente en las muestras se debe a las condiciones ambientales y propias de cada área del laboratorio.

Figura 4

Resultados de las placas control durante los muestreos ambientales pasivos mediante sedimentación en placa Petri luego de 48 h de incubación a 37 °C en el Laboratorio de Biotecnología de la Sede de Occidente de la Universidad de Costa Rica



Las placas control se mantuvieron abiertas dentro de la zona estéril del laboratorio (flujo laminar) durante el mismo tiempo de apertura (2 h) que las demás placas. La ausencia de CFU en las placas control valida el muestreo microbiológico del resto de las áreas del laboratorio, además del procedimiento y manejo de la técnica aséptica del protocolo implementado. Todas las placas contienen agar nutritivo marca Difco™ como medio de cultivo general, a una concentración de 23 g/L.

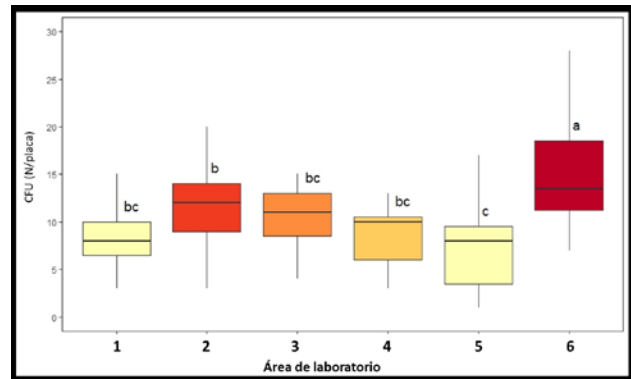
3.2 Resultados del estudio del potencial de contaminación por áreas de laboratorio

Como se observa en la Figura 5, utilizando la metodología desarrollada en este estudio, existen diferencias estadísticamente significativas en la contaminación promedio (CFU) de cada área monitoreada durante los muestreos ambientales pasivos mediante sedimentación en placa Petri. El análisis de varianza basado en la distribución de Poisson indicó que existe un efecto del área de laboratorio (ver Figura 1) sobre la producción de colonias CFU ($\chi^2_{5, 89} = 52.42, p < 0.05$) (ver Anexo 1). Cabe resaltar que el modelo estadístico utilizado contempla la alta variabilidad obtenida en cada semana durante los muestreos pasivos ambientales (se incluyó como variable bloque en el modelo).

La prueba *post-hoc* de Tukey HSD (Figura 5) indicó las diferencias significativas entre las áreas de interés en cuanto al potencial de contaminación de cada una. Es importante recalcar que el área 6 (área de lavado) es estadísticamente diferente a todas las demás y presenta el mayor potencial de la contaminación promedio. En contraste, el área 5 (área de trabajo) presenta el menor potencial de contaminación promedio en comparación con las demás zonas del laboratorio. La Figura 5 muestra en detalle el potencial de contaminación por CFU promedio de cada área.

Figura 5

Box plot de las CFU promedio según el área de laboratorio aplicando muestreos ambientales pasivos mediante sedimentación en placa Petri en el Laboratorio de Biotecnología de la Sede de Occidente de la Universidad de Costa Rica



Nota. Elaboración propia por medio el programa estadístico abierto R ("R Project for Statistical Computing: a Language and Environment for Statistical Computing").

Para el cálculo del promedio, se utilizaron los datos de CFU recabados durante 5 semanas de muestreo. Para comparar estadísticamente las 6 áreas de laboratorio de interés (1= área de equipos; 2, 3 y 5= áreas de trabajo; 4= área de preparación de cristalería; 6= área de lavado; ver Figura 1), se utilizó un modelo generalizado lineal basado en la distribución de Poisson (ANOVA), seguido de un análisis *post-hoc* de Tukey HSD utilizando un nivel de significancia de 0.05 (ver Anexo 1). Las áreas con letras distintas presentan diferencias estadísticamente significativas entre ellas. El modelo estadístico aplicado (tanto para el análisis de varianza con distribución Poisson como para la prueba de Tukey) contempló el efecto de los bloques (semanas) sobre la respuesta (CFU). El color de las cajas está relacionado a la magnitud de CFU promedio (más oscuras poseen mayor CFU promedio). Las barras de error representan la desviación estándar del grupo de datos.

La existencia de diferencias significativas en cuanto a la contaminación promedio de las áreas muestreadas, indica que existe un efecto propio del área sobre el potencial de contaminación (Figura 5). Lo anterior puede atribuirse a la naturaleza de las actividades que se realizan en cada espacio; a la ubicación específica dentro del laboratorio que propicia ciertas condiciones microbiológicas (por ejemplo, ubicación respecto a puertas o respecto al aire acondicionado); o a los procedimientos de limpieza rutinarios que se desarrollan en cada zona particular. Los resultados obtenidos en este estudio coinciden con los publicados en los estudios de Napoli et al. (2012), Herrera et al. (2012) y Quishpe-Nasimba (2021), donde demostraron que la carga contaminante de diferentes áreas de un mismo espacio varía según factores como ubicación específica de la zona muestreada, así como del manejo específico que se le da usualmente a cada una (Herrera et al., 2012).

Además, la alta variabilidad obtenida en la producción de CFU en cada semana de muestreo es esperada (de ahí la importancia de incluir el factor “semana” como bloque en los modelos estadísticos), y se le atribuye a la variabilidad propia que presentan las muestras microbiológicas. Estas están directamente influenciadas por factores como cantidad de personas que tienen actividades en el lugar de muestreo, naturaleza de las tareas realizadas y factores ambientales propios del espacio temporal preciso en el que se desarrolla la toma de datos (Loaiza Hernández y Ruiz Acero, 2019; Luoma y Batterman, 2000). De este modo, se concuerda con la realidad de los muestreos realizados en este estudio, debido a que el Laboratorio de Biotecnología de la Sede de Occidente es un laboratorio para fines principalmente pedagógicos, que presenta un tránsito variado de usuarios de diferente preparación y experiencia (desde estudiantes hasta investigadores, funcionarios administrativos y docentes) los cuales realizan diversidad de labores en horarios cambiantes (docencia, investigación, limpieza, entre otros).

Los datos recabados indicaron que el área 6 (área de lavado) es estadísticamente distinta de las demás, con un mayor promedio de CFU generadas. Esto revela que el área de lavado del laboratorio es la que presenta un mayor potencial de contaminación que el resto de las zonas analizadas (ver Figura 5). Estos resultados son congruentes con la naturaleza de las actividades que se realizan en esta área ya que, al ser un cuarto de lavado, alberga material con residuos y contaminantes de todas las actividades realizadas en el laboratorio, por lo que se espera que la carga contaminante de esta zona sea elevada. Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos en la investigación realizada por Charry y Gómez (2016), quienes también detectaron que, entre las áreas estudiadas, el área de lavado poseía una mayor contaminación en un laboratorio de microbiología farmacéutica.

Adicionalmente, el análisis de Tukey (Figura 5) indica que las áreas de laboratorio 2, 3 y 4 no presentan diferencias estadísticamente significativas en cuanto a su potencial de contaminación. Además, estas tres áreas presentaron los niveles de contaminación más altos después del área 6 por lo que se puede afirmar que el potencial de contaminación de estas zonas es considerable. Lo anterior se le puede atribuir a que estas áreas de laboratorio corresponden a zonas donde los estudiantes realizan trabajos rutinarios relacionados con cursos o asistencias para proyectos de investigación, lo que implican un flujo constante de usuarios del laboratorio que realizan una gran diversidad de actividades asociadas a estas áreas. Según Romero-Bohórquez et al. (2016) y Loaiza Hernández y Ruiz Acero (2019), durante monitoreos ambientales realizados en laboratorios universitarios de Microbiología es común obtener altos potenciales de contaminación en las zonas de trabajo donde los estudiantes realizan sus funciones.

Finalmente, las áreas que presentaron un menor potencial de contaminación fueron la 1 y 5 correspondientes al área de equipos de laboratorio y a un área de trabajo respectivamente. Además, con base en el análisis de Tukey (Figura 5), estas zonas no presentaron diferencias significativas en

cuanto a la generación de CFU promedio durante los muestreos ambientales pasivos realizados en este estudio. Lo anterior se le podría atribuir a que estos espacios están destinados principalmente al uso de equipos y preparación de reactivos, por lo que el desempeño de actividades que puedan perturbar el ambiente o aportar contaminantes en las mismas es reducido. Además, la zona 5 que es un área de trabajo para estudiantes es la menos utilizada (en comparación con el área 2 y 3), especialmente durante el contexto de la pandemia por COVID19 que reducía considerablemente la cantidad de personas en los espacios del Laboratorio de Biotecnología de la Sede de Occidente.

IV. Conclusiones

Se logró desarrollar un protocolo de muestreo ambiental pasivo mediante sedimentación en placa Petri para cuantificar el potencial de contaminación microbiológica en distintas áreas del Laboratorio de Biotecnología de la Sede de Occidente de la Universidad de Costa Rica. Esta metodología permitió el monitoreo e identificación de las áreas con mayor potencial de contaminación.

Las condiciones optimizadas para el protocolo de monitoreo ambiental pasivo desarrollado incluyó un tiempo de apertura de placa de 2 h y una incubación a 37 °C por 48 h para la generación adecuada de las CFU durante muestreos semanales.

Los muestreos ambientales pasivos mediante sedimentación en placa Petri realizados permitieron evaluar el potencial de contaminación por medio de conteos semanales de CFU en las 6 zonas principales del laboratorio. El área que obtuvo un mayor potencial de contaminación fue la correspondiente al cuarto de lavado y autoclave, seguida de dos de las áreas principales de trabajo para estudiantes e investigadores, incluyendo la de preparación de cristalería. La zona que presentó la menor generación de CFU durante los muestreos semanales fue la correspondiente a la preparación de reactivos y uso de equipos de laboratorio.

V. Agradecimientos

Este trabajo fue posible gracias al apoyo fundamental de la PhD. Laura Solís Ramos de la Escuela de Biología de la Sede Rodrigo Facio. Además, se agradece el constante apoyo y colaboración de la Coordinación de Investigación de la Sede de Occidente.

VI. Bibliografía

- Aguilar-Cascante, F. (2000). *Análisis De Las Fuentes De Contaminación En Un Laboratorio De Cultivo De Tejidos: Detección Y Medidas De Control*. Instituto Tecnológico de Costa Rica. <https://repositoriotec.tec.ac.cr/bitstream/handle/2238/12/BJFIB20015.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Ashour, M., Mansy, M. y Eisha, M. (2011). Microbiological Environment Monitoring in Pharmaceutical Facility. *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences*, 3(1), 63-74.
- Briceño L., Puebla A., Guerra, A., Jensen F., Núñez B., Ulloa, F. y Osorio A. (2009). Septicemia fatal causada por *Vibrio cholerae* no-01, no-0139 hemolítico en Chile: Caso clínico. *Revista Médica de Chile*, 137(9), 1193-1196. <https://doi.org/10.4067/S0034-98872009000900008>
- Bykowski, T. y Stevenson, B. (2020). Aseptic Technique. *Current Protocols in Microbiology*, 56(1), 1-11. <https://doi.org/10.1002/cpmc.98>
- Charry, N. y Gómez, S. (2016). Determinación de los límites de la contaminación microbiana presente en superficies de un laboratorio de referencia distrital de microbiología farmacéutica. *Journal of Pharmacy and Pharmacognosy Research*, 4(3), 115-121.

- Dennis, V., Owora, A. y Kirkpatrick, A. (2015). Comparison of Aseptic Compounding Errors Before and After Modified Laboratory and Introductory Pharmacy Practice Experiences. *American Journal of Pharmaceutical Education*, 79(10), 158. <https://doi.org/10.5688/ajpe7910158>
- Ezzelle, J., Rodriguez, I., Darden, J., Stirewalt, M., Kunwar, N., Hitchcock, R., Walter, T., y D'Souza, M. (2008). Guidelines on good clinical laboratory practice: Bridging operations between research and clinical research laboratories. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 46(1), 18–29. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.10.010>
- Flores-Rubio, D. (2018). *Monitoreo ambiental micológico en ambientes internos del Área Histórica de la Biblioteca General de la Universidad Central del Ecuador*. Universidad Central del Ecuador.
- Forbes, B., Sahm, D. y Weissfeld, A. (2009). *Diagnóstico Microbiológico* (12th Ed.). Editorial Panamericana.
- Genzen, J. (2020). Wiping the Slate Clean—Assessing Clinical Laboratory Contamination Risk. *Clinical Chemistry*, 66(9), 1128–1130. <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaa161>
- Gordon, O., Berchtold, M., Staerk, A. y Roesti, D. (2014). Comparison of Different Incubation Conditions for Microbiological Environmental Monitoring. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 68(5), 394–406. <https://doi.org/10.5731/pdajpst.2014.00994>
- Herrera, K., Cobar, O., De León, J., Rodas, A., Boburg, S., Quan, J., Pernilla, L., Mancilla, C. y Gudiel, H. (2012). Impacto de la calidad microbiológica del aire externo en el ambiente interno de cuatro laboratorios de instituciones públicas en la ciudad de Guatemala y Bárcenas, Villa Nueva. *Revista Científica*, 22(1), 30–38. <https://doi.org/10.54495/Rev.Cientifica.v22i1.120>
- Junco, R. y Rodríguez, C. (2001). Cultivo y crecimiento de los microorganismos. En A.-Llop, M. Váldez-Dapena, & J. Zuazo (Eds.), *Microbiología y Parasitología Médicas* (Tomo 1, Issue January, pp. 45–54). Editorial de Ciencias Médicas.
- Lavelle, L. (2020). Good Manufacturing Practices : Aseptic and Sterile Processing. *Pharmaceutical Technology Europe*, 28, 28–29.
- Leifert, C., Morris, C. E. y Waites, W. M. (1994). Ecology of Microbial Saprophytes and Pathogens in Tissue Culture and Field-Grown Plants: Reasons for Contamination Problems In Vitro. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 13(2), 139–183. <https://doi.org/10.1080/07352689409701912>
- Leifert, C. y Woodward, S. (1998). Laboratory contamination management: the requirement for microbiological quality assurance. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 52, 83–88.
- Loaiza Hernández, M. y Ruiz Acero, L. (2019). *Análisis del riesgo microbiológico del aire en dos laboratorios de la Universidad Santo Tomás Sede Villavicencio Campus Aguas Claras*. Universidad de Santo Tomás.

- Luoma, M. y Batterman, S. (2000). Autocorrelation and Variability of Indoor Air Quality Measurements. *AIHAJ - American Industrial Hygiene Association*, 61(5), 658–668. <https://doi.org/10.1080/15298660008984575>
- Mroginski, L. y Roca, W. (1991). *Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones*. CIAT.
- Napoli, C., Tafuri, S., Montenegro, L., Cassano, M., Notarnicola, A., Lattarulo, S., Montagna, M. T. y Moretti, B. (2012). Air sampling methods to evaluate microbial contamination in operating theatres: results of a comparative study in an orthopaedics department. *Journal of Hospital Infection*, 80(2), 128–132. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2011.10.011>
- Pasquarella, C., Pitzurra, O. y Savino, A. (2000). The index of microbial air contamination. *Journal of Hospital Infection*, 46(4), 241–256. <https://doi.org/10.1053/jhin.2000.0820>
- Pérez, H. y Sánchez, V. (2010). Propuesta de diseño de monitoreo ambiental microbiológico para diagnóstico de niveles de contaminación en áreas de procesamiento aséptico. *ICIDCA Sobre Los Derivados de La Caña de Azúcar*, 44(3), 7–14. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223120684002>
- Quishpe-Nasimba, J. (2021). *Evaluación microbiológica de la calidad del aire en las áreas del Laboratorio de Microbiología del Hospital de Especialidades de las Fuerzas Armadas N°1* [ESPE, Universidad de las Fuerzas Armadas]. <https://medium.com/@arifwicaksanaa/pengertian-use-case-a7e576e1b6bf>
- Rojas, O. (2017). Determinación de la contaminación bacteriana por aerosoles según localización y tiempo en los ambientes de la clínica docente de la UPC [Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas]. <https://repositorioacademico.upc.edu.pe/bitstream/handle/10757/621649/original.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Romero-Bohórquez, C., Castañeda, D. y Acosta, G. (2016). Determinación de la calidad bacteriológica del aire en un laboratorio de microbiología en la Universidad Distrital Francisco José de Caldas en Bogotá, Colombia. *Nova*, 14(26), 101–109. <https://doi.org/10.22490/24629448.1756>
- Sanders, E. (2012a). Aseptic Laboratory Techniques: Plating Methods. *Journal of Visualized Experiments*, 63, 1–18. <https://doi.org/10.3791/3064>
- Sanders, E. (2012b). Aseptic Laboratory Techniques: Volume Transfers with Serological Pipettes and Micropipettors. *Journal of Visualized Experiments*, 63, 1–12. <https://doi.org/10.3791/2754>
- Shiferaw, T., Gebr-silasse, L., Mulisa, G., Zewidu, A., Belachew, F., Muleta, D. y Zemene, E. (2016). Bacterial Indoor-Air Load and its Implications for Healthcare-Acquired Infections in a Teaching Hospital in Ethiopia. *International Journal of Infection Control*, 12(1), 1. <https://doi.org/10.3396/IJIC.v12i1.004.16>
- Sieuwert, S., de Bok, F., Mols, E., de Vos, W. y Hylckama, V. (2008). A simple and fast method for determining colony forming units. *Letters in Applied Microbiology*, 47(4), 275–278. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02417.x>

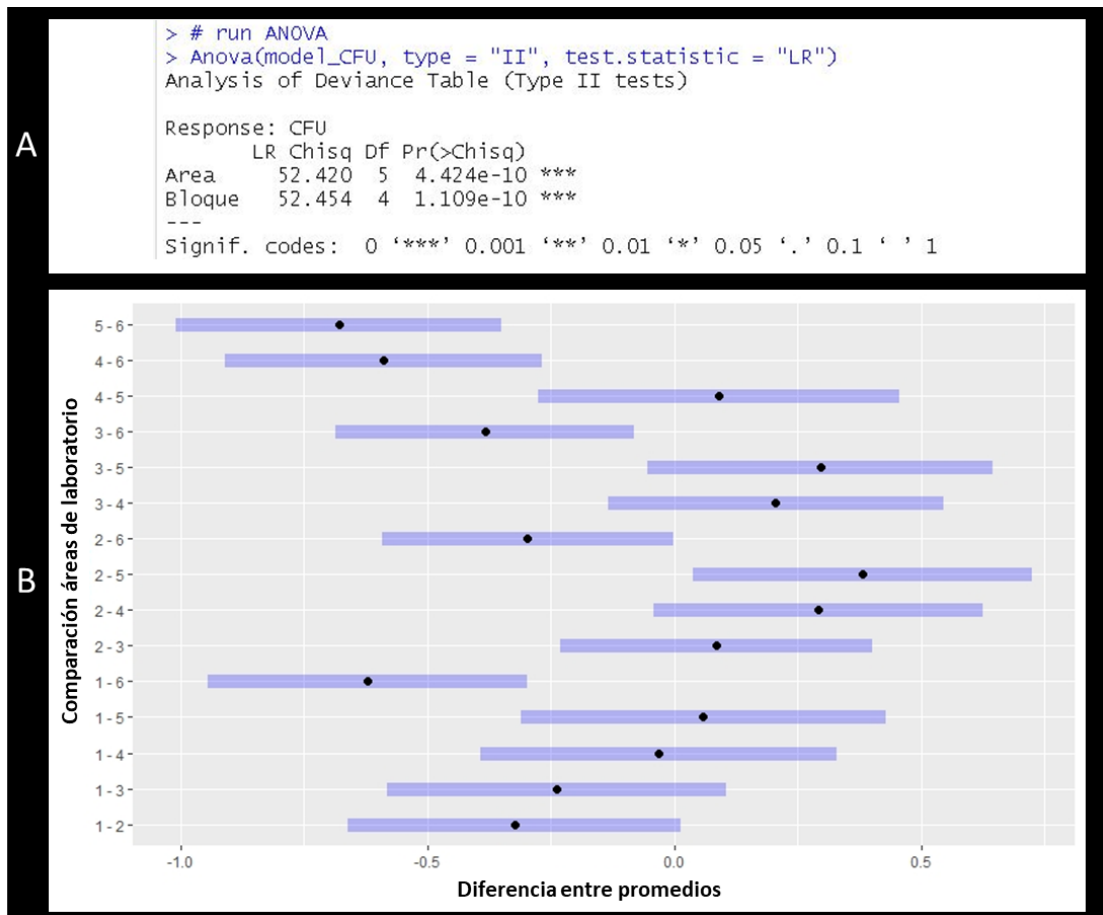
Solano Barquero, M., Chacón, L., Barrantes, K. y Achí, R. (2013). Implementación de dos métodos de recuento en placa para la detección de colifagos somáticos, aportes a las metodologías estándar. *Revista Peruana de Biología*, 19(3), 335–340. <https://doi.org/10.15381/rpb.v19i3.1050>

Stärk, A. (2020). Microbiological Environmental Monitoring. En D. Roesti y M. Goverde (Eds.), *Pharmaceutical Microbiological Quality Assurance and Control* (pp. 231–264). John Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/9781119356196.ch8>

Stevens, W. (2003). Good clinical laboratory practice (GCLP): the need for a hybrid of good laboratory practice and good clinical practice guidelines/standards for medical testing laboratories conducting clinical trials in developing countries. *Quality Assurance*, 10(2), 83–89. <https://doi.org/10.1080/10529410390262727>

Suvikas-Peltonen, E., Hakoinen, S., Celikkayalar, E., Laaksonen, R. y Airaksinen, M. (2017). Incorrect aseptic techniques in medicine preparation and recommendations for safer practices: a systematic review. *European Journal of Hospital Pharmacy*, 24(3), 175–181. <https://doi.org/10.1136/ejhpharm-2016-001015>

VII. Anexos



Anexo 1. Tabla de ANOVA (A) y análisis pos-hoc de Tukey HSD (B) donde se muestran las comparaciones pareadas entre las 6 áreas de laboratorio estudiadas (1= área de equipos; 2, 3 y 5= áreas de trabajo; 4= área de preparación de cristalería; 6= área de lavado; ver Figura 1) con respecto a las unidades formadoras de colonias promedio (CFU) durante los muestreos ambientales pasivos en el Laboratorio de Biotecnología de la Sede de Occidente. Fuente: elaboración propia, utilizando el programa estadístico abierto R (“R Project for Statistical Computing: a Language and Environment for Statistical Computing” <https://www.R-project.org/>).