

Riesgo biológico en la industria biotecnológica

*Biological risk in the biotechnology industry
Le risque biologique dans l'industrie de la biotechnologie*

Redactora:

Ana Hernández Calleja
Licenciada en Ciencias Biológicas

CENTRO NACIONAL DE CONDICIONES
DE TRABAJO

Por industria biotecnológica se entiende un conjunto de procesos cuya esencia es el uso deliberado de microorganismos para la obtención de productos y servicios de interés para el hombre. Algunos de los microorganismos utilizados pueden ser perjudiciales para la salud. En esta nota técnica de prevención se pretende revisar los aspectos generales de los procesos más comunes, así como las principales exigencias de bioseguridad relativas a los equipos y a los locales de trabajo.

Las NTP son guías de buenas prácticas. Sus indicaciones no son obligatorias salvo que estén recogidas en una disposición normativa vigente. A efectos de valorar la pertinencia de las recomendaciones contenidas en una NTP concreta es conveniente tener en cuenta su fecha de edición.

1. INTRODUCCIÓN

La microbiología industrial trata del uso de microorganismos y de la aplicación de las técnicas biotecnológicas en procesos industriales para la obtención de productos a través de la fermentación y de servicios beneficiosos para la humanidad. Las técnicas biotecnológicas consisten en la manipulación de los organismos, fundamentalmente a escala genética, para usos específicos. En esos conceptos está comprendida la biotecnología tradicional y la denominada biotecnología moderna en la que la tecnología del ADN recombinante (también llamada ingeniería genética) se ha convertido en parte central de la misma.

La biotecnología tradicional hace referencia a las formas en las que, desde la antigüedad, se han venido usando los seres vivos. Se podría decir que la biotecnología se inicia cuando los humanos, cazadores y recolectores, se convierten en granjeros. Como tales, recolectan plantas salvajes, las cultivan y seleccionan las variedades con un mejor rendimiento para utilizarlas en la siguiente estación. Lo mismo ocurre con la ganadería.

Más adelante y sin conocer su fundamento se descubre como usar determinados procesos biológicos, que ocurren en las células habitualmente. Se descubrieron formas de maduración de diversos alimentos que provocaban cambios de sabor, se trataba del proceso que posteriormente se denominó fermentación, que permitía la transformación de la leche en queso o el jugo de las uvas en vino. Fueron los estudios de Pasteur (1857) sobre la acción de los microorganismos en el proceso de fermentación alcohólica y las técnicas de cultivo puro desarrolladas por Hansen (1883), los avances que dieron lugar a la microbiología industrial. Durante la primera mitad del siglo XX se continuaron produciendo avances en este campo, pero no fue hasta el descubrimiento por parte de Watson y Crick (1953) de la estructura del ácido desoxirribonucleico (ADN) y la forma en la que se transmite la información genética a través de las generaciones, que se inició la biotecnología moderna con el desarrollo de las técnicas del ADN recombinante. Esta tecnología permite la transferencia de genes de una especie a otra y se basa en la inserción de una secuencia específica de

genes de un donante en un huésped adecuado, a través de un vector de expresión.

De la progresión en el desarrollo de la biotecnología se puede inferir su utilidad en diversos campos. El principal es el propio avance de la Biología. En el terreno industrial es necesario destacar sus aplicaciones terapéuticas (medicamentos, vacunas, hormonas, terapias génicas); su aplicación en pruebas diagnósticas; las mejoras en el campo de la alimentación (obtención de alimentos, aditivos alimentarios, alimentos con perfiles nutricionales determinados, etc.); producción de enzimas y otras proteínas, bioinsecticidas, biopolímeros, etc.; su aprovechamiento en la obtención de energía (biomasa) o su utilidad en la mejora del medio ambiente a través de la biorremediación entre otros. En la tabla 1 se recogen algunos ejemplos de microorganismos y sus usos en la industria.

2. FERMENTACIÓN

En el proceso de obtención del producto deseado, los sistemas biológicos actúan como catalizadores de la reacción propiciando que ésta se lleve a cabo en condiciones óptimas y con el mayor rendimiento. Los sistemas biológicos usados son: microorganismos, cultivos celulares, enzimas o esporas. De todos ellos destacan los microorganismos debido a dos razones fundamentales: su elevada diversidad y plasticidad metabólica y la sencillez y economía de su cultivo.

La operación tiene dos fases: la de preparación, incluyendo la fermentación, y la de obtención del producto. En la figura 1 se muestra un esquema de un proceso de fermentación y la curva de desarrollo microbiano en condiciones de cultivo discontinuo.

La fase de preparación se puede dividir en tres etapas principales: la producción del inóculo, la preparación del medio de cultivo y la propia fermentación. La fase de obtención del producto, con las variaciones propias del tipo de producto elaborado, incluye todos los procesos que siguen a la fermentación. A continuación se describen brevemente las diferentes etapas.

Microorganismos	Aplicación
<i>Saccharomyces</i>	Bebidas alcohólicas (vino, cerveza), biomasa (levadura panificación).
<i>Lactobacillus</i> y bacterias lácticas	Ácido láctico, queso, yogur, embutidos, col fermentada, etc.
<i>Acetobacter</i>	Ácido acético.
<i>Aspergillus</i>	Ácido cítrico, enzima amilasa, biosensores (análisis de glucosa).
<i>Corynebacterium</i>	Aminoácidos (L-Glutámico, L-Lisina).
<i>Pseudomonas</i>	Vitamina B12, biodegradación de hidrocarburos.
<i>Alcaligenes</i>	Bioplásticos.
<i>Streptomyces</i>	Tetraciclinas, transformación de esteroides.
<i>Penicillium</i>	Antibióticos.
<i>Bacillus</i>	Antibióticos, bioinsecticidas, enzimas (proteasas).
<i>Salmonella</i>	Test mutagénicos (test de Ames).
<i>Escherichia</i>	Hormonas, interferón humano.
<i>Thiobacillus</i>	Biolixiviación.
Bacterias aerobias	Depuración de aguas residuales.
Bacterias anaerobias	Biodigestión anaerobia (metano).

Tabla 1. Microorganismos y sus aplicaciones industriales más frecuentes

Preparación del inóculo

Los aspectos clave de esta etapa consisten en:

- La localización de un microorganismo de interés industrial. Normalmente ese microorganismo provendrá de colecciones o bien de las cepas salvajes existentes en la naturaleza. Pero además, el microorganismo debe cumplir con una serie de condiciones que idealmente serían las siguientes:
 - Ser genéticamente estable.
 - Tener una ruta biosintética bien caracterizada y una eficiente producción del producto de interés. Sin otros productos que dificulten los procesos de recuperación.
 - Presentar escasa o nula necesidad de vitaminas u otros factores de crecimiento.
 - Ser capaz de utilizar una amplia gama de sustratos (fuentes de carbono) asequibles y económicos.
 - Tener requisitos de crecimiento que dificulten posibles contaminaciones (por ejemplo: pH determinados, temperaturas elevadas, etc.).
 - Ser susceptible de manipulación genética.
 - Ser seguro, no patógeno y no producir agentes tóxicos (excepto cuando son el producto buscado).
 - Elaborar productos fácilmente recuperables.
- La mejora de los microorganismos para incrementar la productividad y el rendimiento. Este aspecto se puede lograr mejorando las condiciones de cultivo (medio, parámetros, etc.) o modificando su genoma. Las técnicas para lograr este punto son las siguientes: mutagénesis, fusión de protoplastos o ADN recombinante. Las dos primeras tienen un componente aleatorio importante y requieren de procesos de selección posteriores. En cambio, con la técnica del ADN recombinante, se elabora el microorganismo específico que producirá el producto deseado.

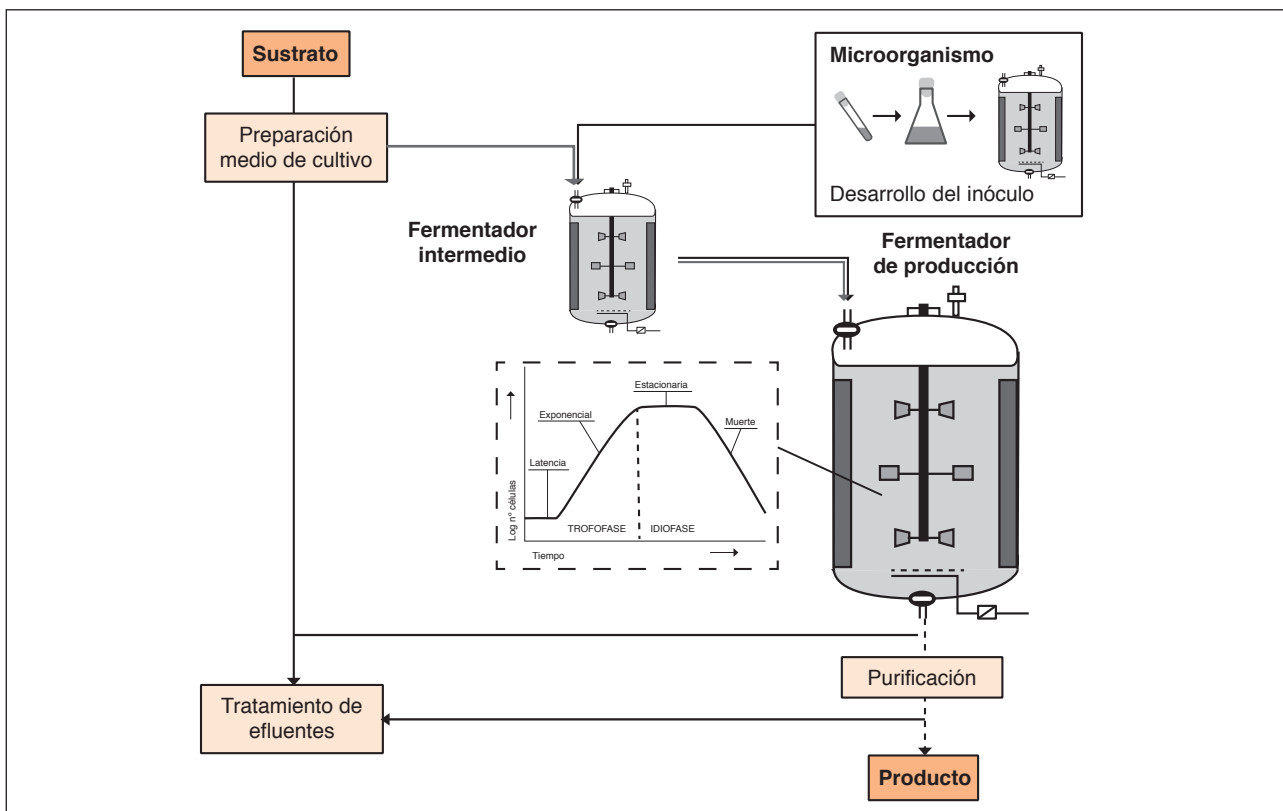


Figura 1. Esquema del proceso de fermentación y crecimiento microbiano

- El mantenimiento de la pureza de la cepa que implica toda una serie de procesos de conservación de las mismas. Las más utilizadas son: subcultivos sucesivos, con el inconveniente de su posible contaminación, cambio por mutación o muerte del cultivo; conservación de esporas, únicamente válido para los microorganismos que las producen; la congelación y la liofilización siendo éstas las que mejores resultados ofrecen.
- La comprobación de que sus capacidades se mantienen en las condiciones que regirán el proceso industrial.
- La facilidad de recuperación del producto final.

Preparación del medio de cultivo

Los aspectos principales en este apartado son: la selección de los sustratos (fuentes de carbono y energía) y de otros nutrientes esenciales, así como la optimización de las condiciones del medio de cultivo para conseguir el máximo rendimiento y producción.

Los sustratos más comúnmente utilizados en las fermentaciones son: melazas; extracto de malta; almidón y dextrinas; líquidos sulfúricos de las papeleras; celulosa, aceites vegetales, etanol, alcanos (C₁₂ - C₁₈); extracto de levaduras, peptonas o líquido de maceración del maíz como fuente de nitrógeno y de aminoácidos.

Fermentación

Es el proceso en que los microorganismos son cultivados en condiciones rigurosamente controladas que han sido desarrolladas para optimizar el crecimiento del microorganismo (biomasa) o el producto deseado. El microorganismo aumenta su concentración mientras que el medio se va modificando por la formación de nuevos productos. El comportamiento de un microorganismo es sensible a las condiciones de operación del proceso como por ejemplo: la temperatura, la aireación, la agitación, tipo de alimentación del proceso, etc., que pueden condicionar la producción de algún metabolito.

El fermentador, las conducciones, los elementos de sellado y los equipos asociados deben ser contruidos con materiales, usualmente acero inoxidable, que permitan sucesivas esterilizaciones, que no reaccione de forma adversa con el microorganismo o con el producto y que aseguren la estanqueidad del proceso con el objeto de evitar contaminaciones tanto hacia el interior del fermentador como hacia el ambiente de trabajo. En la figura 2 se muestra un esquema de un fermentador aireado con agitación y los elementos de control del proceso.

Los principales elementos asociados al fermentador son: el aporte de aire (estéril) cuando así se requiera, el mecanismo de agitación que homogenice el medio y las sustancias que se aporten, las sondas de control de los diferentes parámetros (temperatura, pH, oxígeno disuelto, etc.), los mecanismos o productos antiespumantes, etc.

Tipos de proceso

Se pueden distinguir tres tipos de procesos en función de la cinética del mismo y de la incorporación del medio de cultivo: discontinuos, discontinuos con alimentación y continuo. La elección del proceso depende del sistema biológico escogido y del producto que se pretenda obtener, según sea éste un metabolito primario o secundario o la formación de biomasa.

En los cultivos discontinuos los nutrientes están presentes desde el inicio y a lo largo del proceso sólo se

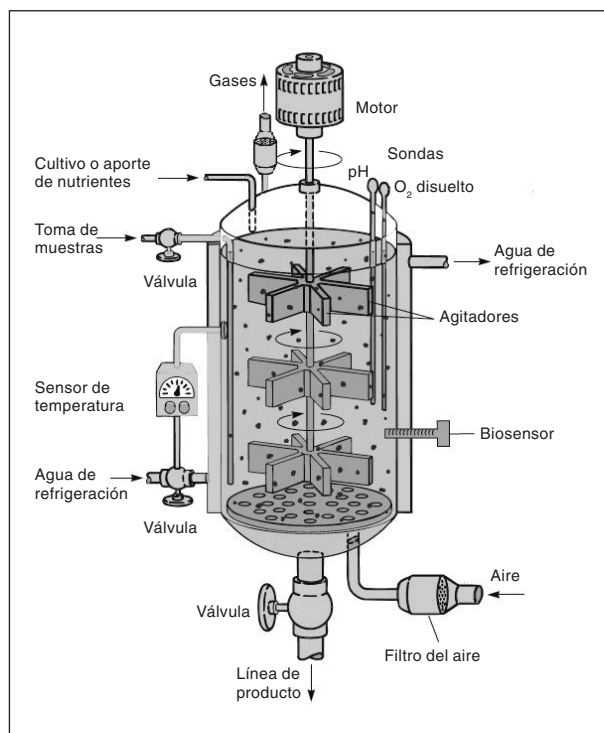


Figura 2. Esquema de un fermentador

incorporan los elementos destinados al control y mantenimiento de las condiciones preestablecidas del proceso (ácidos o bases para el mantenimiento del pH, aire, etc.). El modelo de crecimiento discontinuo permite explicar el desarrollo microbiano y es uno de los tipos más utilizados en la industria. En la figura 3 se muestra la curva que describe las diferentes fases de crecimiento, también recogida en la figura 1 a menor tamaño.

Dependiendo del origen, edad, concentración o viabilidad del inóculo, se puede producir una fase de latencia en la que no hay crecimiento, pero sí actividad metabólica de adaptación a los nutrientes disponibles. Una vez se ha producido la adaptación, la división celular se acelera aumentando su frecuencia hasta su valor máximo dando comienzo la fase exponencial. Durante esta fase o trofofase, se produce el crecimiento celular y se producen los metabolitos primarios. A medida que disminuyen los nutrientes se produce una desaceleración del crecimiento. Cuando todo el nutriente crítico se ha metabolizado el cultivo entra en la fase estacionaria

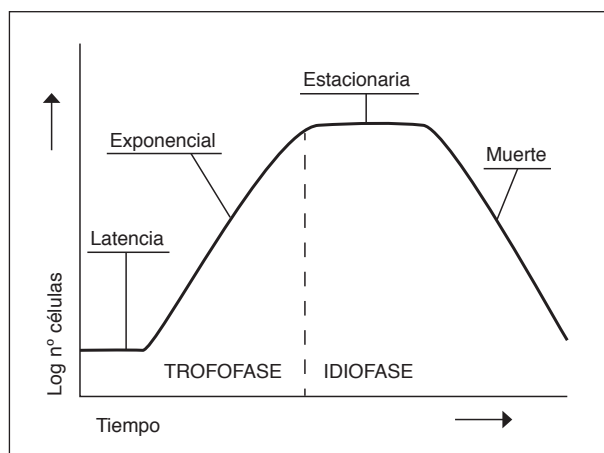


Figura 3.

(la tasa de división celular es igual a la tasa de muerte celular). En esta fase, o idiofase, los microorganismos siguen activos metabolizando los compuestos almacenados intracelularmente y, en algunos casos, produciendo metabolitos secundarios. También durante esta fase se producen las esporas. A continuación se inicia la fase de muerte en la que se produce de forma exponencial la muerte celular y, en ocasiones, la lisis o rotura celular.

En los cultivos discontinuos con alimentación, los nutrientes críticos se van incorporando a lo largo de todo el proceso en dosis pequeñas. Este es el tipo de cultivo que se utiliza para la síntesis de metabolitos secundarios.

Los cultivos continuos se utilizan cuando el producto de interés se produce en la fase exponencial. El mantenimiento de esta fase se consigue equilibrando la entrada de nutriente con la extracción de cultivo.

Obtención del producto

Finalmente, tras la fermentación se ha de recuperar el producto. Las técnicas disponibles son múltiples, pero en su elección hay que tener en cuenta diversos factores: si presenta actividad biológica o es un producto inerte, dónde se ubica (dentro o fuera de la célula), sus características fisicoquímicas, su concentración, el grado de pureza necesario, etc.

Entre las técnicas de recuperación más frecuentemente utilizadas se pueden destacar las siguientes: sedimentación, centrifugación, floculación, filtración, cromatografía (de adsorción, de intercambio iónico, de exclusión molecular, de afinidad), electroforesis, diálisis, osmosis inversa, cristalización, liofilización, lisis física, química o enzimática, etc.

3. RIESGO BIOLÓGICO

Buena parte de los microorganismos utilizados en los procesos biotecnológicos no suponen ningún peligro para las personas, de hecho, uno de los requisitos ideales del microorganismo es que éste sea seguro, no patógeno y sin efectos tóxicos. Sin embargo existen determinados procesos en los que necesariamente intervienen microorganismos peligrosos, por ejemplo, la fabricación de vacunas o la obtención de determinados productos con efectos tóxicos.

La propia definición de los procesos industriales biotecnológicos revela uno de los principales factores de riesgo existente: la utilización de microorganismos en la producción de productos o servicios. Ningún ejemplo mejor de lo que significa “actividad con intención deliberada de utilizar agentes biológicos”, en la que es obligada la

presencia del agente biológico, y que define uno de los ámbitos de aplicación del Real Decreto 664/1997, sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo. Sin embargo, la mera utilización de un agente biológico no significa que exista un riesgo para los trabajadores que lo manejan, será condición indispensable que, además, la exposición al agente tenga efectos adversos para la salud.

El artículo 2 del Real Decreto contiene la definición de lo que se entiende legalmente como agente biológico y los principales efectos asociados a la exposición a los mismos. Son agentes biológicos: microorganismos, con inclusión de los genéticamente modificados, cultivos celulares y endoparásitos humanos, susceptibles de originar cualquier tipo de infección, alergia o toxicidad.

En la definición quedan incluidos: los virus, las bacterias, los hongos (naturales y los modificados genéticamente), los cultivos celulares (fundamentalmente por su posible contaminación por virus) y los organismos que colonizan el interior del cuerpo humano (protozoos y gusanos parásitos), que causen cualquiera de los efectos mencionados. Se excluyen de la definición legal: los organismos que parasitan el exterior del cuerpo humano (ácaros, piojos, etc.), las toxinas y venenos producidos por seres vivos (artrópodos, plantas, animales) y las sustancias derivadas de los agentes biológicos con efectos tóxicos o alérgicos cuando éstas se manejen de forma aislada, es decir, sin la presencia del agente productor. Por ejemplo, los enzimas purificados utilizados en la fabricación de detergentes no tendrían consideración de agente biológico, sin embargo, esos mismos enzimas durante su producción por un microorganismo sí serían considerados agentes biológicos.

En el artículo 3 del Real Decreto “Clasificación de los agentes biológicos”, se proporcionan los criterios por los que los agentes biológicos se clasifican en cuatro grupos atendiendo al riesgo de infección que suponen y que se resumen en la tabla 2.

El Anexo II del Real Decreto contiene la lista de los agentes biológicos clasificados por el momento en los distintos grupos y, la información sobre sus efectos alérgicos (A) o tóxicos (T).

En el caso de los organismos modificados genéticamente (OMG), a la hora de analizar su potencial peligrosidad, se ha de tener en cuenta, además de la peligrosidad del organismo receptor, otros aspectos como son: el organismo donante, el vector utilizado, el inserto y el OMG resultante. La peligrosidad intrínseca del organismo receptor vendrá reflejada por el grupo en el que esté clasificado. La del inserto tiene que ver con la actividad biológica potencialmente peligrosa de los productos que

Agente biológico del grupo de riesgo	Riesgo infeccioso	Riesgo de propagación a la colectividad	Profilaxis o tratamiento eficaz
1	Poco probable que cause enfermedad	No	Innecesario
2	Pueden causar una enfermedad y constituir un peligro para los trabajadores	Poco Probable	Disponible
3	Puede causar una enfermedad grave y presenta un serio peligro para los trabajadores	Probable	Disponible
4	Causan una enfermedad grave y suponen un serio peligro para los trabajadores	Elevado	No conocido

Tabla 2. Grupos de riesgo de los agentes biológicos

codifican (toxinas, oncogenes, etc.). La del OMG deberá valorarse atendiendo a su viabilidad (capacidad de desarrollo y diseminación) y la probabilidad de que ocurran sucesos infrecuentes (mutaciones, reversiones, etc.). Sin ser de aplicación directa, la clasificación de agentes biológicos del Real Decreto 664/1997 puede servir de orientación a la hora de estimar la peligrosidad del OMG y de las actividades donde se utilicen.

4. EVALUACIÓN DE RIESGOS

El procedimiento de evaluación de riesgos por exposición a agentes biológicos queda recogido en el artículo 4 del Real Decreto 664/1997 y en el artículo 12 y el anexo I del Real Decreto 178/2004, por el que se aprueba el Reglamento general para el desarrollo y ejecución de la Ley 9/2003, por la que se establece el régimen jurídico de la utilización confinada, liberación voluntaria y comercialización de organismos modificados genéticamente. El primero se aplica a los agentes biológicos naturales mientras que el segundo es de aplicación a los OMG.

Los principios de evaluación de riesgos no difieren, en cualquier caso, de los establecidos en la normativa general de Prevención: determinar la naturaleza, el grado y la duración de la exposición. Es decir, estimar el nivel de riesgo en términos de probabilidad de materialización de daños y la gravedad de sus consecuencias, y eliminar o minimizar el riesgo mediante la aplicación de las medidas de control pertinentes.

La evaluación de riesgos debe hacerse teniendo en cuenta toda la información disponible y en particular:

- La naturaleza de los agentes biológicos y el grupo en el que están clasificados.
- La información sobre las enfermedades susceptibles de ser contraídas por los trabajadores por su actividad profesional.
- Los efectos potenciales, tanto alérgicos como tóxicos, que puedan derivarse de la actividad laboral de los trabajadores.
- Las recomendaciones de las autoridades sanitarias sobre la conveniencia de controlar el agente biológico con el objeto de proteger la salud de los trabajadores que estén o puedan estar expuestos a dicho agente por razón de su trabajo.
- El riesgo adicional para aquellos trabajadores especialmente sensibles en función de sus características o estado biológico conocido (patologías previas, medicación, trastornos inmunitarios, embarazo o lactancia).
- Cuando se trata de OMG, además, se deben considerar los efectos deletéreos debidos a su establecimiento o a la diseminación en el medio ambiente y los efectos deletéreos debidos a la transferencia natural de material genético insertado a otros organismos, aunque estos últimos no son considerados en esta nota técnica de prevención.

5. MEDIDAS PREVENTIVAS Y DE CONTENCIÓN

El resultado de la evaluación de riesgos ha de permitir determinar las actuaciones preventivas y la extensión de las mismas, en función del tipo de actividad desarrollada. Los procesos industriales biotecnológicos, como se

ha indicado anteriormente, son actividades con intención deliberada de manipular agentes biológicos, por lo que, además de las medidas preventivas y de control establecidas en el articulado del Real Decreto 664/1997, se deben aplicar las medidas especiales establecidas en el artículo 15 y en los anexos IV y V del mismo. En concreto para procedimientos industriales, el punto 2 del citado artículo requiere el establecimiento de un nivel de contención, así como de las medidas de contención que figuran en el anexo V, de forma que las actividades que supongan manipulación del agente biológico se ejecuten únicamente en zonas de trabajo que correspondan por lo menos a un nivel de contención 2 para un agente biológico del grupo 2, a un nivel de contención 3 para un agente biológico del grupo 3 y a un nivel 4 para un agente biológico del grupo 4. Cuando no haya sido posible proceder a una evaluación concluyente de un agente biológico, pero de cuya utilización prevista parece que puede derivarse un riesgo grave para la salud de los trabajadores, únicamente podrán realizarse en locales de trabajo cuyo nivel de contención corresponda, al menos, al nivel 3.

En el caso de los OMG, en el artículo 12 del Real Decreto 178/2004, las actividades de utilización confinada de OMG se clasifican, en función de la evaluación previa de los riesgos para la salud humana y el medio ambiente, en cuatro tipos:

- Tipo 1. Actividades con riesgo nulo o insignificante: aquellas en las que el grado 1 de confinamiento es suficiente para proteger la salud humana y el medio ambiente.
- Tipo 2. Actividades de bajo riesgo: las que requieren el grado 2 de confinamiento.
- Tipo 3. Actividades de riesgo moderado: las que requieren el grado 3 de confinamiento.
- Tipo 4. Actividades de alto riesgo: las que requieren el grado 4 de confinamiento.

Un caso particular lo constituyen aquellos procesos industriales realizados a cielo abierto como son los denominados de biorremediación a los cuales no es posible aplicar los principios de contención/confinamiento, pero sí todas aquellas medidas preventivas oportunas que se deriven de la evaluación de riesgos para el control del riesgo.

Las tablas 3 y 4 contienen las medidas y la exigencia en su cumplimiento para los procedimientos industriales biotecnológicos, tanto los contemplados en el anexo V (RD 664/1997) como en el anexo II (RD 178/2004). En ambos casos, las medidas son equivalentes, aunque su número total, su formulación y la exigencia en su cumplimiento puedan diferir ligeramente, en cualquier caso, es conveniente recordar que contienen requisitos mínimos. La tabla 4 incorpora el grado de confinamiento 1 establecido para el trabajo con OMG clasificado como "actividad con riesgo nulo o insignificante o Tipo I". Su equivalencia en el anexo V quedaría reflejada en la nota introductoria que dice: "Cuando se trabaje con agentes biológicos del grupo 1, comprendidas las vacunas de gérmenes vivos atenuados, se observarán los principios de correcta seguridad e higiene profesional.

En cada tabla se indica la correspondencia entre las medidas de contención y las de confinamiento. Asimismo se señalan (en sombreado) las discrepancias en cuanto a la exigencia en el cumplimiento de la medida que existen entre ambas.

A. Medidas de contención	B. Niveles de contención		
	2	3	4
1. Los microorganismos viables deberán ser manipulados en un sistema que separe físicamente el proceso del medio ambiente. <i>(Medida 1, tabla 4)</i>	Sí	Sí	Sí
2. Deberán tratarse los gases de escape del sistema cerrado para: <i>(Medida 2, tabla 4)</i>	Minimizar la liberación	Impedir la liberación	Impedir la liberación
3. La toma de muestras, la adición de materiales a un sistema cerrado y la transferencia de organismos viables a otro sistema cerrado deberán realizarse de un modo que permita: <i>(Medida 3, tabla 4)</i>	Minimizar la liberación	Impedir la liberación	Impedir la liberación
4. Los fluidos de grandes cultivos no deberán retirarse del sistema cerrado a menos que los microorganismos viables hayan sido: <i>(Medida 4, tabla 4)</i>	Inactivados mediante medios de eficacia probada	Inactivados mediante medios físicos o químicos de eficacia probada	Inactivados mediante medios físicos o químicos de eficacia probada
5. Los precintos deberán diseñarse con el fin de: <i>(Medida 5, tabla 4)</i>	Minimizar la liberación	Impedir la liberación	Impedir la liberación
6. Los sistemas cerrados deberán ubicarse en una zona controlada: <i>(Medida 13, tabla 4)</i>	Facultativo	Facultativo	Sí, expresamente construida
a) Deberán colocarse señales de peligro biológico. <i>(Medida 15, tabla 4)</i>	Facultativo	Sí	Sí
b) Sólo deberá permitirse el acceso al personal designado. <i>(Medida 14, tabla 4)</i>	Facultativo	Sí	Sí, mediante esclusa de aire. <i>(Medida 8, tabla 4)</i>
c) El personal deberá vestir indumentaria de protección. <i>(Medida 18, tabla 4)</i>	Sí, ropa de trabajo	Sí	Cambiarse completamente
d) Deberá dotarse al personal de instalaciones de descontaminación y lavado.	Sí	Sí	Sí
e) Los trabajadores deberán ducharse antes de abandonar la zona controlada. <i>(Medida 17, tabla 4)</i>	No	Facultativo	Sí
f) Los efluentes de fregaderos y duchas deberán recogerse e inactivarse antes de su liberación. <i>(Medida 22, tabla 4)</i>	No	Facultativo	Sí
g) La zona controlada deberá ventilarse adecuadamente para reducir al mínimo la contaminación atmosférica. <i>(Medida 10, tabla 4)</i>	Facultativo	Facultativo	Sí
h) En la zona controlada deberá mantenerse una presión del aire negativa respecto a la atmósfera. <i>(Medida 11, tabla 4)</i>	No	Facultativo	Sí
i) Se deberá tratar con filtros «HEPA» el aire de entrada y salida de la zona controlada. <i>(Medida 12, tabla 4)</i>	No	Facultativo	Sí
j) Deberá diseñarse la zona controlada para impedir la fuga del contenido del sistema cerrado. <i>(Medida 6, tabla 4)</i>	No	Facultativo	Sí
k) Se deberá poder precintar la zona controlada para su fumigación. <i>(Medida 7, tabla 4)</i>	No	Facultativo	Sí
l) Tratamiento de efluentes antes de su vertido final. <i>(Medida 23, tabla 4)</i>	Inactivados mediante medios de eficacia probada	Inactivados mediante medios físicos o químicos de eficacia probada	Inactivados mediante medios físicos o químicos de eficacia probada

Tabla 3. Anexo V del Real Decreto 664/1997, Indicaciones relativas a las medidas de contención y a los niveles de contención para procesos industriales

Especificaciones	Grado de confinamiento			
	1	2	3	4
Disposiciones generales				
1. Los organismos viables deben mantenerse en un sistema que separe el proceso del entorno (sistema cerrado). <i>(Medida 1, tabla 3)</i>	Opcional	Exigida	Exigida	Exigida
2. Control de los gases de escape del sistema cerrado. <i>(Medida 2, tabla 3)</i>	No exigida	Exigida, minimizando la liberación	Exigida, evitando la liberación	Exigida, evitando la liberación
3. Control de aerosoles durante la toma de muestras, la introducción del material en un sistema cerrado o la transferencia de material a otro sistema cerrado. <i>(Medida 3, tabla 3)</i>	Opcional	Exigida, minimizando la liberación	Exigida, evitando la liberación	Exigida, evitando la liberación
4. Inactivación del líquido de cultivo en masa antes de extraerlo del sistema cerrado. <i>(Medida 4, tabla 3)</i>	Opcional	Exigida con medios validados	Exigida con medios validados	Exigida con medios validados
5. Sistemas de cierre diseñados para minimizar o evitar la liberación. <i>(Medida 5, tabla 3)</i>	Ningún requisito específico	Minimizar la liberación	Evitar la liberación	Evitar la liberación
6. Zona controlada con capacidad para contener el vertido de todo el contenido del sistema cerrado. <i>(Medida 6 j, tabla 3)</i>	Opcional	Opcional	Exigida	Exigida
7. Zona controlada hermética para fumigación. <i>(Medida 6 k, tabla 3)</i>	No exigida	Opcional	Opcional	Exigida
Equipo				
8. Entrada a través de esclusa.	No exigida	No exigida	Opcional	Exigida
9. Superficies resistentes a ácidos, álcalis, disolventes, desinfectantes y agentes de descontaminación y de fácil limpieza.	Exigida (mesa, si la hay)	Exigida (mesa, si la hay)	Exigida (mesa, si la hay, y suelo)	Exigida mesa, suelo, techo y paredes)
10. Medidas específicas para ventilar adecuadamente la zona controlada y de ese modo minimizar la contaminación atmosférica. <i>(Medida 6 g, tabla 3)</i>	Opcional	Opcional	Opcional	Exigida
11. Zona controlada con presión negativa respecto a la presión circundante. <i>(Medida 6 h, tabla 3)</i>	No exigida	No exigida	Opcional	Exigida
12. Tratamiento del aire de salida y entrada de la zona, filtrado con filtros HEPA. <i>(Medida 6 i, tabla 3)</i>	No exigida	No exigida	Exigida (aire de salida, facultativa para el aire de entrada)	Exigida (aire de entrada y de salida)
Normas de trabajo				
13. Sistemas cerrados situados en una zona controlada. <i>(Medida 6, tabla 3)</i>	No exigida	Opcional	Exigida	Exigida
14. Acceso restringido exclusivamente al personal autorizado. <i>(Medida 6 b, tabla 3)</i>	No exigida	Exigida	Exigida	Exigida
15. Obligación de indicar el peligro biológico. <i>(Medida 6 a, tabla 3)</i>	No exigida	Exigida	Exigida	Exigida
17. El personal deberá ducharse antes de abandonar la zona controlada. <i>(Medida 6 e, tabla 3)</i>	No exigida	No exigida	Opcional	Exigida
18. Indumentaria de protección para el personal. <i>(Medida 6 c, tabla 3)</i>	Exigida (indumentaria de trabajo)	Exigida (indumentaria de trabajo)	Exigida	Cambio completo de indumentaria antes de entrar y de salir
Residuos				
22. Inactivación de los OMG en los efluentes de lavabos, desagües y duchas o efluentes similares. <i>(Medida 6 f, tabla 3)</i>	No exigida	No exigida	Opcional	Exigida
23. Inactivación de los OMG en el material contaminado y en los residuos, incluidos los OMG presentes en el efluente de trabajo antes del vertido final. <i>(Medida 6 l, tabla 3)</i>	Opcional	Exigida, con medios validados	Exigida, con medios validados	Exigida, con medios validados

Tabla 4. Organismos Modificados Genéticamente. Cuadro II "Medidas de confinamiento y otras medidas de protección para otras actividades". Del Anexo II del Real Decreto 178/2004

BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

MINISTERIO DE TRABAJO Y ASUNTOS SOCIALES.

Real Decreto 664/1997, de 12 de mayo, sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo.

INSTITUTO NACIONAL DE SEGURIDAD E HIGIENE EN EL TRABAJO

Guía técnica para la evaluación y prevención de los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos.

MINISTERIO DE LA PRESIDENCIA

Real Decreto 178/2004, por el que se aprueba el Reglamento general para el desarrollo y ejecución de la Ley 9/2003, de 25 de abril, por la que se establece el régimen jurídico de la utilización confinada, liberación voluntaria y comercialización de organismos modificados genéticamente.

HEALTH AND SAFETY EXECUTIVE

The large-scale contained use of biological agents.

HSE books <http://books.hse.gov.uk/hse/public/saleproduct.jsf?catalogueCode=9780717615445>

WAITES, M. J., MORGAN, N. L., ROCKEY, J. S. and HIGTON, G.

Industrial Microbiology: An Introduction.

London. Wiley-Blackwell 1 edition 2001.