

Universidad de Valladolid

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍAS AGRARIAS

Grado en Ingeniería Forestal y del Medio Natural

Proyecto de diseño de una línea de producción de
hongos y bacterias para la mejora de suelos
forestales.

Alumno: Rodrigo Herrera Sanz

Tutor: María Elena Hidalgo Rodríguez

Cotutor: Joaquín Navarro Hevia

Director: Jaime Olaizola Suárez

Junio 2020

ÍNDICE GENERAL

DOCUMENTO Nº 1. MEMORIA

ANEJOS A LA MEMORIA:

ANEJO I: DESCRIPCIÓN DE LOS ORGANISMOS

ANEJO II: ESTUDIO DE ALTERNATIVAS

ANEJO III: IDENTIFICACIÓN GENÉTICA

ANEJO IV: DISEÑO DE LA LÍNEA PRODUCTIVA

ANEJO V: DESCRIPCIÓN DE LA NAVE DE PRODUCCIÓN

ANEJO VI: PROGRAMACIÓN PARA LA EJECUCIÓN DEL PROYECTO

ANEJO VII: ESTUDIO DE IMPACTO AMBIENTAL

ANEJO VIII: ESTUDIO BÁSICO DE SEGURIDAD Y SALUD

ANEJO IX: VIABILIDAD Y COMPETENCIA

ANEJO X: JUSTIFICACIÓN DE PRECIOS

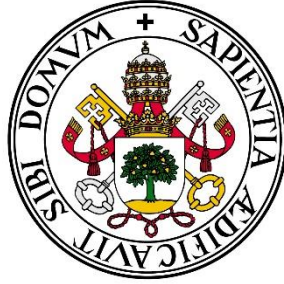
ANEJO XI: BIBLIOGRAFÍA

DOCUMENTO 2. PLANOS

DOCUMENTO 3. PLIEGO DE CONDICIONES

DOCUMENTO 4. MEDICIONES

DOCUMENTO 5. PRESUPUESTO



Universidad de Valladolid

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍAS AGRARIAS

Grado en Ingeniería Forestal y del Medio Natural

Proyecto de diseño de línea de producción de
bacterias y hongos para la mejora de suelos
forestales.

DOCUMENTO N°1. MEMORIA

Alumno: Rodrigo Herrera Sanz

Tutor: María Elena Hidalgo Rodríguez

Cotutor: Joaquín Navarro Hevia

Director: Jaime Olaizola Suárez

Índice de la Memoria

1. OBJETO Y ALCANCE DEL PROYECTO	1
1.1 NATURALEZA DEL PROYECTO	1
1.2 LOCALIZACIÓN DEL PROYECTO	1
2. ANTECEDENTES	1
3. BASES DEL PROYECTO	2
3.1 DIRECTRICES DEL PROYECTO	2
3.1.1 Finalidad del proyecto	2
3.1.2 Condicionantes impuestos por el promotor	2
3.1.3 Criterios de Valor	2
3.1.4 Disposiciones legales y normas aplicadas	3
3.1.5 Bibliografía	3
3.2 CONDICIONANTES DEL PROYECTO	7
3.2.1 Condicionantes Internos del Proyecto	7
3.2.1.1 <i>Trichoderma spp.</i>	7
3.2.1.1.1 <i>Trichoderma harzianum</i>	8
3.2.1.1.2 <i>Trichoderma atroviride</i>	8
3.2.1.2 <i>Pseudomonas spp</i>	9
3.2.1.2.1 <i>Pseudomonas fluorescens</i>	9
3.2.1.2.2 <i>Pseudomonas putida</i>	10
3.2.2 Condicionantes Externos	11
3.2.2.1 Condicionantes Económicos	11
3.2.2.2 Condicionantes en relación con las Infraestructuras	11
4. SITUACIÓN ACTUAL	11
5. ALTERNATIVAS DEL PROYECTO	12
5.1 ALTERNATIVAS DEL ANÁLISIS GENÉTICO	12

5.1.1 Extracción y amplificación del ADN	12
5.2 PROTOCOLO A SEGUIR	13
5.3 FORMULACIÓN	14
5.4 ELECCIÓN DE LA MAQUINARIA	15
5.5 EFECTO DE LAS ALTERNATIVAS SOBRE LOS OBJETIVOS DEL PROYECTO	16
6. INGENIERÍA DEL PROYECTO	16
6.1 PROTOCOLO DE PRODUCCIÓN	16
6.2 DEFINICIÓN DE LA LÍNEA DE PRODUCCIÓN	16
6.3 PROGRAMA PRODUCTIVO	17
6.4 PROGRAMACIÓN DE LA EJECUCIÓN Y PUESTA EN MARCHA DEL PROYECTO	18
7. NORMAS PARA LA EXPLOTACIÓN DEL PROYECTO	18
8. PRESUPUESTO DEL PROYECTO	19
9. EVALUACIÓN INTERNA DEL PROYECTO	20
9.1 VIDA ÚTIL DEL PROYECTO	20
9.2 PLAN FINANCIERO	20
9.3 BENEFICIOS Y COSTES DEL PROYECTO	20
9.4 EVALUACIÓN ECONÓMICA DEL PROYECTO	21
9.5 EVALUACIÓN SOCIAL	22
9.6 EVALUACIÓN AMBIENTAL	22
10. ORDEN Y PRIORIDAD DE DOCUMENTOS	22

1. OBJETO Y ALCANCE DEL PROYECTO

El presente proyecto titulado “Proyecto de diseño de una línea de producción de bacterias y hongos para la mejora de suelos forestales”, ha sido elaborado por Rodrigo Herrera Sanz, estudiante del Grado de Ingeniería Forestal y del Medio Natural de la Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias (ETSIIAA), de la Universidad de Valladolid, bajo la tutela de la Doctora en biología Doña María Elena Hidalgo Rodríguez, el Doctor en ingeniería de montes Don Joaquín Navarro Hevia, profesores titulares ambos en la misma universidad y bajo la dirección de Don Jaime Olaizola Suarez, Doctor en microbiología e ingeniero de montes.

Así mismo el proyecto ha sido promovido por la empresa IDForest-Biotecnología Forestal Aplicada S.L., situada en la ciudad de Palencia (Palencia), con domicilio en Calle Curtidores número 17, la cual ha colaborado en la realización del presente proyecto que será utilizado para su explotación industrial. La actividad de esta empresa se centra en la investigación y desarrollo de nuevas técnicas y productos, desarrollo de proyectos de control de plagas, producción de hongos e identificación genética y asesoramiento de empresas.

El proyecto se llevará a cabo en la ciudad de Palencia en las instalaciones pertenecientes a la empresa promotora del proyecto, cuya dirección es la misma que la del domicilio de la empresa.

1.1 NATURALEZA DEL PROYECTO

El propósito del presente proyecto es el planteamiento, diseño y evaluación de una línea de producción de bacterias y hongos con el objetivo de mejorar el crecimiento, rendimiento, productividad y salud de las masas forestales, ya sean naturales o plantaciones. En él se diseñarán los protocolos de producción y los procesos de producción, formulación y empaquetado del producto final.

Por las características y comportamiento que presentan, las especies objetivo son los hongos ascomicetes del género *Trichoderma spp*, *T. harzianum* y *T. atroviride*, y las bacterias del género *Pseudomonas spp*, *P. fluorescens* y *P. putida*. Estos organismos presentan interesantes características y capacidades con respecto al control de patógenos, captación y suministro de nutrientes a la planta hospedante, regulación de su crecimiento y activación de su sistema defensivo.

1.2 LOCALIZACIÓN DEL PROYECTO

El proyecto se localiza en el municipio de Palencia, capital de la provincia homónima, en las instalaciones pertenecientes a la empresa promotora. Estas se sitúan en el polígono industrial San Antolín, con dirección en la calle Curtidores número 17.

2. ANTECEDENTES

La situación actual, en la que existe una creciente preocupación sobre el medioambiente y las consecuencias de nuestras actividades sobre este, está dando como resultado nuevas tendencias de consumo y la aprobación de normativas nacionales e internacionales sobre el uso de fertilizantes y pesticidas químicos más restrictivas. Esto,

unido a que la demanda de productos forestales sigue creciendo, hace esencial la disponibilidad de productos que cumplan con la nueva legislación y demandas sociales. De esta forma, la producción y venta de organismos como los considerados en el presente proyecto presenta un gran interés económico, además de contribuir a la protección del medioambiente.

Sin embargo, debido a lo novedoso de este proyecto y al secreto industrial, no se dispone de información detallada sobre trabajos y proyectos similares, a ningún tipo de nivel geográfico (local, regional, nacional o internacional). Los proyectos más similares que se pueden encontrar son los desarrollados por ciertas instituciones y fundaciones nacionales que, actualmente, investigan sobre la producción de bacterias y microorganismos para la obtención de distintos compuestos. Sin embargo, no hay trabajos previos disponibles en el campo que nos ocupa.

3. BASES DEL PROYECTO

3.1 DIRECTRICES DEL PROYECTO

3.1.1 Finalidad del Proyecto

El fin del presente proyecto es el desarrollo de los protocolos de producción y el diseño y puesta en marcha de las líneas de producción de las especies de hongos *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma atroviride* y de las especies de bacterias *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas putida*; organismos que contribuyen a mejorar la salud, resistencia y resiliencia de las masas y plantaciones forestales. Adicionalmente se pretende generar actividad y rendimientos económicos a través de su producción y venta, principalmente a propietarios de tierras y plantaciones forestales y agrícolas.

3.1.2 Condicionantes Impuestos por el Promotor

Entre las condiciones requeridas por el promotor, en este caso la empresa IDForest-Biotecnología Forestal Aplicada S.L. encontramos los siguientes de carácter económico, social y medioambiental:

- Producción de los microorganismos nombrados anteriormente (*T. harzianum*, *T. atroviride*, *P. fluorescens* y *P. putida*)
- Maximización de la eficiencia del proceso productivo
- Minimización de la inversión y de los costes de producción
- Provisión de productos que cumplan con los fines y estándares del proyecto
- Minimización del impacto medioambiental del proceso de producción

3.1.3 Criterios de Valor

Debido a las condiciones que limitan el proyecto se deberá valorar su calidad, una vez llevado a cabo y según los siguientes criterios:

- El nivel de adaptación del proyecto a las especies objetivo
- El impacto económico del proyecto en la zona en la que se implanta
- La inversión a realizar
- El impacto medioambiental del proyecto
- La calidad del producto final

3.1.4 Disposiciones legales y normas aplicadas

Debido a que en el presente proyecto se desarrollará el proceso productivo de un compuesto biológico, considerado como fertilizante y destinado a su aplicación en el medio natural debemos tener en cuenta la legislación vigente relacionada con estos temas.

Las leyes y normas que influyen en el proyecto son las siguientes:

- Real Decreto 999/2017, de 24 de noviembre, por el que se modifica el Real Decreto 506/2013, de 27 de junio, sobre productos fertilizantes.
- Reglamento (UE) 2019/2009, de 5 de junio de 2019, del parlamento europeo y del consejo por el que se establecen disposiciones relativas a la puesta a disposición en el mercado de los productos fertilizantes UE y se modifican los Reglamentos (CE) n.o 1069/2009 y (CE) n.o 1107/2009 y se deroga el Reglamento (CE) n.o 2003/2003.
- Ley 31/1995, de 8 de noviembre, de prevención de Riesgos Laborales.
- Real Decreto 374/2001, de 6 de abril, sobre la protección de la salud y seguridad de los trabajadores contra los riesgos relacionados con los agentes químicos durante el trabajo y su modificación por parte del Real Decreto 598/2015, de 3 de julio.
- 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.
- Real Decreto 485/1997, de 14 de abril, sobre disposiciones mínimas en materia de señalización de seguridad y salud en el trabajo y su modificación por parte del Real Decreto 598/2015, de 3 de julio.
- Real Decreto 773/1997, de 30 de mayo, sobre disposiciones mínimas de seguridad y salud relativas a la utilización por los trabajadores de equipos de protección individual.
- Real Decreto 1215/1997, de 18 de julio, por el que se establecen las disposiciones mínimas de seguridad y salud para la utilización por los trabajadores de los equipos de trabajo.
- Real Decreto 513/2017, de 22 de mayo, por el que se aprueba el reglamento de instalaciones de protección contra incendios.

3.1.5 Bibliografía

- A.Q. Rajput, M.A. Khanzada & S. Shahzad. 2014. "Effect of Different Organic Substrates and Carbon and Nitrogen Sources on Growth and Shelf Life of *Trichoderma harzianum*". Journal of Agricultural Science and Technology: 731-742
- E. Donoso, G.A. Lobos & N. Rojas. 2008. "Efecto de *Trichoderma harzianum* y compost sobre el crecimiento de *Pinus radiata* en vivero". BOSQUE: 52-57

-S.A. Nusaibah & H. Musa. 2019. "A Review on the Mechanism of *Trichoderma* spp. as Biological Control Agent of the Basal Stem Rot (BSR) Disease of *Elaeis guineensis*".

-J. Williams et al. 2003. "A Selective Medium for Quantitative Reisolation of *Trichoderma harzianum* from *Agaricus bisporus* Compost" Applied and Environmental Microbiology: 4190-4191.

-J.M. Steyaert et al. 2010. "Reproduction without sex: conidiation in the filamentous fungus *Trichoderma*" Microbiology, 156: 2887-2900.

-N. Carreras-Villaseñor, J.A. Sánchez-Arreguín & A. Herrera-Estrella. 2011. "Trichoderma: Sensing the environment for survival and dispersal" Microbiology, 158: 3-16.

-E. Gamalero & B.R. Glick. "Mechanisms Used by Plant Growth-Promoting Bacteria". Chapter 2. 2011.

-P. Chaverri et al. 2015. "Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the identification of commercial biocontrol strains".

-C.M. Monreal et al. 2014. "Metabolism of n-C_{10:0} and n-C_{11:0} FATTY ACIDS BY *Trichoderma koningii*, *Penicillium janthinellum* and their mixed culture: I. Biomass and CO₂ production, and allocation of intracellular lipids".

-M. Shahid et al. 2014. "Optimal Physical Parameters for Growth of *Trichoderma* species at Varying pH, Temperature and Agitation" Virology and Micology, 3.

-B.C. Rossi-Rodrigues et al. 2009. "Comparative growth of *Trichoderma* strains in different nutritional sources, using bioscreen C automated system" Brazilian Journal of Microbiology, 40: 404-410.

-K. Brunner et al. 2005. "Improvement of the Fungal Biocontrol Agent *Trichoderma atroviride* to Enhance both Antagonism and Induction of Plant Systemic Disease Resistance" Applied and Environmental Microbiology, 71: 3959-3965.

-N. Benhamou & I. Chet. 1996. "Parasitism of Sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*: Ultrastructural and Cytochemical Aspects of the Interaction" Soil Biology and Biochemistry, 16: 381-386.

-A. Schuster & M. Schmoll. 2010. "Biology and biotechnology of *Trichoderma*" Applied Microbiology and Biotechnology, 87: 787-799.

-L. Soesanto, D.S. Utami & R.F. Rahayuniati. 2011. "Morphological characteristics of four *Trichoderma* isolates and two endophytic *Fusarium* isolates" Canadian Journal on Scientific and Industrial Research, 8: 294-306.

-G.E. Harman. Cornell University. "*Trichoderma* spp., including *T. harzianum*, *T. viride*, *T. koningii*, *T. hamatum* and other spp. Deuteromycetes, Moniliales (asexual classification system)".

-G.J. Samuels. 2005. "*Trichoderma*: Systematics, the Sexual State, and Ecology" Phytopatology, 96: 195-206.

- I. Druzhinina & C.P. Kubicek. 2005. "Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters?" Journal of Zhejiang University SCIENCE B, 6: 100-120.
- S. Jang et al. 2018. "New Report of Three Unrecorded Species in *Trichoderma harzianum* Species Complex in Korea" M International Journal of Food microbiology, 39: 53-60. Microbiology, 46: 177-184.
- G.E. Harman et al. 2004. "TRICHODERMA SPECIES- OPPORTUNISTIC, AVIRULENT PLANT SYMBIONTS" Nature Reviews Microbiology, 2: 43-56.
- J.F.S. Daniel & E.R. Filho. 2007. "Peptaibols of *Trichoderma*" Natural Product Reports, 24: 1128-1141.
- G. Ganeshan & A.M. Kumar. 2007. "*Pseudomonas fluorescens*, a potential bacterial antagonist to control plant diseases" Journal of Plant Interactions, 1: 123-134.
- L.Dias dos Anjos Gonçalves et al. 2017. "Predictive modeling of *Pseudomonas fluorescens* growth under different temperature and pH values" Brazilian Journal of Microbiology, 48.
- A.E. LaBauve & M.J. Wargo. 2015. "Growth and Laboratory Maintenance of *Pseudomonas aeruginosa*" Current protocols in microbiology Chapter 6.
- B.S. Scales, R.P. Dickson, J.J. LiPuma & G.B. Huffnagle. 2014. "Microbiology, Genomics and Clinical Significance of the *Pseudomonas fluorescens* Species Complex, an Unappreciated Colonizer of Humans" Clinical Microbiology Reviews, 27: 927-948.
- A. Passer & M. Khan. "*Pseudomonas fluorescens* grows better in glucose-enriched LB media than in LB media alone".
- Center for Biofilm Engineering. Montana State University. "Biofilm Basics: Section 1".
- N.M. Elekhtyar. 2015. "Efficiency of *Pseudomonas fluorescens* as Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) for the Enhancement of Seedling Vigo, Nitrogen Uptake, Yield and its Attributes of Rice (*Oryza sativa* L.)" Microbiology, 35: 129-134.
- C.J. John et al. 2017. "*Pseudomonas fluorescens* R68 assisted enhancement in growth and fertilizer utilization of *Amaranthus tricolor* (L.)"
- M.V.B. Figueiredo, A. Bonifacio, A.C. Rodrigues & F.F. de Araujo. 2016. "Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Key Mechanisms of Action" Microbial-mediated Induced Systemic Resistance in Plants: 23-34.
- N. Jahan, et al. 2018. "Evaluation of the growth performance of *Trichoderma harzianum* (Rifai.) on different culture media" Journal of Agriculture and Veterinary Science, 3: 44-50.
- "Consensus Document on Information Used in the Assessment of Environmental Applications Involving *Pseudomonas*". OECD 1997.
- I. Lebert, C. Begot & A.M. Lebert. 1998. "Growth of *Pseudomonas fluorescens* and *P.fragi* in a meat medium as affected by pH (5.8-7.0), water activity (0.97-1.00) and temperature (7-25°C)" International Journal of Food microbiology, 39: 53-60.

Alumno: Rodrigo Herrera Sanz

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (CAMPUS DE PALENCIA). E.T.S. de Ingenierías Agrarias

Titulación: Grado en Ingeniería Forestal y del Medio Natural

- K. Brunner et al. 2005. "Improvement of the Fungal Biocontrol Agent *Trichoderma atroviride* to Enhance both Antagonism and Induction of Plant Systemic Disease Resistance" *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 3959-3965.
- U. Schnider et al. 1999. "Oxygen-Sensing Reporter Strain of *Pseudomonas fluorescens* for Monitoring the Distribution of Low-Oxygen Habitats in Soil" *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 4085-4093.
- Hao Lin. B.S. 2015. "Prediction of Growth of *Pseudomonas fluorescens* Under Temperature Fluctuation" *Journal of Dairy Science*, 99: 1-9.
- R. Noor, Z. Zeba & M.S. Munna. 2016. "Influence of temperature on the growth of *Pseudomonas putida*" *Stamford Journal of Microbiology*, 5: 9-12.
- R.Y. Stainer, N.J. Palleroni & M. Doudoroff. 1965. "The Aerobic Pseudomonads: a Taxonomic Study". Department of Bacteriology and Immunology, University of California, Berkeley, California, U.S.A.
- P. Fonseca, R. Moreno & F. Rojo. 2011. "Growth of *Pseudomonas putida* at low temperature: global transcriptomic and proteomic analyses" *Environmental Microbiology Reports*, 3: 329-339.
- C. Petrisor, A. Paica & F. Constantinescu. 2016. "INFLUENCE OF ABIOTIC FACTORS ON IN VITRO GROWTH OF *TRICHODERMA* STRAINS" *The Publishing House of the Romanian Academy*: 11-14.
- A. Zehra, M.K. Dubey, M. Meena & R. Upadhyay. 2017. "Effect of different environmental conditions on growth and sporulation of some *Trichoderma* species" *Journal of Environmental Biology*, 38: 197-203.
- G.R. Knudsen & L. Bin. 1990. "Effects of Temperature, Soil Moisture and Wheat Bran on Growth of *Trichoderma harzianum* from Alginate Pellets" *Phytopathology*, 80: 724-727.
- R.K. Jayaswal, R. Singh & Y. Su Lee. 2003. "Influence of Physiological and Environmental Factors on Growth and Sporulation of an Antagonistic Strain of *Trichoderma viride* RSR 7" *Microbiology*, 31: 36-41.
- S. Aryal. 2018. "Nutrient Agar: Composition, Preparation and Uses".
- J. Stoops, P. Maes, J. Claes & L.V. Campenhout. 2011. "Growth of *Pseudomonas fluorescens* in modified atmosphere packaged tofu" *Letters in Applied Microbiology* 54: 195-202.
- N.A. Sinclair & J.L. Stokes. 1961. "Factors Which Control Maximal Growth of Bacteria" *Journal of Bacteriology*, 83: 1147-1154.
- E. Belal & M. El-Nady. 2013. "Bioremediation of pendimethalin-contaminated soil" *African Journal of Microbiology Research*, 7: 2574-2588.
- J.M. Kanyinda & P. Thonart. 2013. "Optimisation of production, freeze-drying and storage of *Pseudomonas fluorescens* BTP1".

- D. Stephan, A.P. Matos Da Silva & I.L. Bisutti. 2015. "Optimization of a freeze-drying process for the biocontrol agent *Pseudomonas spp.* And its influence on viability, storability and efficacy".
- D. Witkowska et. al. 2017. "Effect of Lyophilization on Survivability and Growth Kinetic of *Trichoderma* Strains Preserved on Various Agriculture By-Products".
- M. Czarnecka et al. 2018. "The effect of lyophilization and storage time on the survival rate and hydrolytic activity of *Trichoderma* strains".
- S. Peighami-Ashnaei et al. 2009. "Interaction of different media on production and biocontrol efficacy of *Pseudomonas fluorescens* P-35 and *Bacillus subtilis* B-3 against grey mould of apple".
- I. Coban & S. Sargin. 2019. "Production of *Trichoderma* propagules as a biocontrol agent in static liquid culture conditions by using an integrated bioreactor system".
- S.E. Vecht et. al. 1988." The growth of *Pseudomonas putida* on m-toluic acid and on toluene in batch and chemostat cultures".
- A.A. Aguayo et. al. 2018. "Efecto de *Trichoderma harzianum* en el control de mildiu (*Pseudoperonospora cubensis*) en pepino"
- J.B. Merchán-Gaitán et. Al. "Efecto de dos cepas de *Trichoderma* en el control de *Botrytis cinerea* y la calidad del fruto en fresa (*Fragaria spp.*)"
- J.A. Oria de Rueda Salgueiro. 2018. "HISTORIA DE LOS BOSQUES Y DE LA NATURALEZA DE PALENCIA".
- J.A. Oria de Rueda Salgueiro. 2015. "LOS PAISAJES DE PALENCIA".
- Plan General de Ordenación Urbana de Palencia: Impacto Ambiental. 2008.
- "Global Biofertilizers Market Analysis, Trends, and Forecasts 2020-2025". Businesswire. 2020.

3.2 CONDICIONANTES DEL PROYECTO

3.2.1 Condicionantes Internos del Proyecto

Como ya se ha indicado anteriormente las especies objetivo son las *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR) pertenecientes al género *Pseudomonas spp.* y los hongos del género *Trichoderma spp.*, debido a su papel como biofertilizadores y bioprotectores de las plantas en la rizosfera.

De esta forma trabajamos con organismos diferentes que presentan distintos ciclos biológicos, ecologías y necesidades en su crecimiento y desarrollo. Por ello las características del proyecto se deben adaptar a la ecología y condiciones requeridas por ambos microorganismos.

3.2.1.1 *Trichoderma spp.*

Las especies consideradas pertenecen al género *Trichoderma spp.* son hongos que llevan a cabo acciones con efecto fungicida; protectores y promotores de la respuesta

Alumno: Rodrigo Herrera Sanz

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (CAMPUS DE PALENCIA). E.T.S. de Ingenierías Agrarias

Titulación: Grado en Ingeniería Forestal y del Medio Natural

autoinmune y crecimiento de los hospedantes. *Trichoderma harzianum* (Risei. 1969) y *Trichoderma atroviride* (Karsten.1892) presentan características que van a influir en el diseño del proyecto, ello hace que sean considerados condicionantes del proyecto.

3.2.1.1.1 *Trichoderma harzianum*

Es uno de los miembros más estudiados del género debido a su función en el suelo y a sus múltiples usos. Desarrolla su vida principalmente en la rizosfera, estableciendo una relación mutualista con la planta hospedante.

Es un hongo termófilo, cuyo rango de temperaturas óptimo oscila entre 25 y 30 °C aunque es capaz de sobrevivir en un amplio rango de temperaturas y de desarrollar nuevo tejido entre los 20 °C y los 40 °C.

Con respecto a las características del suelo, requiere un ambiente ligeramente ácido, con valores de pH en torno a 6 y 6,5; en el que nutrientes como el hierro, normalmente inaccesible al presentarse en forma de hidróxidos, sean fácilmente solubilizables. Estos procesos de solubilización se llevan a cabo mediante la producción y liberación de sideróforos.

Debido a las diversas adaptaciones que presenta es capaz de medrar en medios con falta o inaccesibilidad de nutrientes, pero requiere un constante suministro de carbono y nitrógeno. Al mismo tiempo, al ser un organismo aerobio necesita un suministro regular de oxígeno. Las condiciones óptimas para el desarrollo de *Trichoderma harzianum* se resumen en la Tabla1.

Tabla 1: Tabla resumen de las condiciones óptimas para el desarrollo de *Trichoderma harzianum*.

Temperatura	25 - 30 °C
pH	6 - 6,5
Requerimientos nutricionales	Suministro constante de carbono y nitrógeno (10/1 C/N)
Suministro de Oxígeno	Suministro constante

Desarrolla una reproducción asexual a través de conidios cuya producción puede ser inducida por cambios en las condiciones ambientales.

Su acción en la rizosfera se basa en la detección y eliminación de otros hongos, potencialmente patógenos para la planta, mediante la secreción de enzimas, que abren acceso al lumen del hospedador objetivo. De forma adicional, también desencadena y refuerza la respuesta defensiva de la planta hospedante mediante la secreción de ciertos químicos y hormonas; además incrementa la disponibilidad de nutrientes gracias a la producción de sideróforos.

3.2.1.1.2 *Trichoderma atroviride*

Es una de las especies del género *Trichoderma spp.* que mayor potencial presenta como agente biofertilizante y bioprotector. Se encuentra en el suelo, en la rizosfera, estableciendo relaciones mutualistas con los vegetales hospedantes, promoviendo su desarrollo y protegiéndolos de posibles patógenos y de factores abióticos adversos.

Al igual que otros miembros del mismo género presenta una tolerancia térmica amplia, sobreviviendo en el rango de los 12 °C a los 35 °C, y mostrando un desarrollando óptimo entre los 20 °C y los 30 °C. Sus necesidades en cuanto al pH son similares a las de *T. harzianum*, sobreviviendo en el rango de pH 4 y pH 8, y desarrollándose plenamente entre pH 6 y pH 6,5.

Presenta mecanismos propios de su género para la obtención de nutrientes (sideróforos, secreción de ácidos que aumentan la solubilidad de los nutrientes, etc...) y requiere un suministro constante de carbono y nitrógeno. Es un organismo aerobio por lo que necesita un suministro constante y suficiente de oxígeno para su supervivencia y desarrollo.

Las condiciones óptimas para el desarrollo de *Trichoderma atroviride* se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2: Tabla resumen de las condiciones óptimas para el desarrollo de *T. atroviride*.

Temperatura	25 -30 °C
pH	6 - 6,5
Requerimientos nutricionales	Suministro constante de carbono y nitrógeno (15/1 C/N)
Suministro de Oxígeno	Suministro constante

Desarrolla principalmente su fase anamorfa, llevando a cabo una reproducción asexual a través de conidios. La producción de estas esporas se va a ver afectada por factores como la falta de nutrientes, falta de oxígeno, el pH y la incidencia de luz.

En la rizosfera detecta y elimina de potenciales patógenos de la planta hospedante, pero también produce antibióticos y metabolitos secundarios, como terpenos, o gliovirinas, que disminuyen e incluso inhiben el crecimiento de los patógenos. Al igual que otros hongos del mismo género, es capaz de promover el crecimiento de la planta mediante la secreción de fitohormonas y el suministro de nutrientes.

3.2.1.2 *Pseudomonas spp.*

Pseudomonas spp. es un género de bacterias aerobias que se encuentran en el suelo, en el agua y en la superficie de las plantas y que se caracterizan por su acción en la rizosfera. Consideradas como *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR) promueven y fortalecen el crecimiento vegetal y minimiza los daños producidos por patógenos y enfermedades.

3.2.1.2.1 *Pseudomonas fluorescens*

Es una bacteria PGPR que establece relaciones mutualistas con las raíces de las plantas. Presenta una gran resistencia y adaptabilidad a condiciones adversas gracias, principalmente a su capacidad para producir sideróforos y a la creación del biofilm sobre las raíces de la planta.

Sobrevive a un amplio rango de temperaturas, entre los 4 °C y los 32 °C, con un punto óptimo a los 27 °C y un pH entre valores de 4 y 8, con valores óptimos ligeramente ácidos, entre pH 6 y pH 7.

Con respecto a sus necesidades nutricionales presenta gran resistencia en condiciones de falta de nutrientes o de su accesibilidad gracias a la producción de sideróforos y a los exudados provenientes de la planta hospedante. Todo ello hace que pueda ser cultivada en medios de cultivo básicos sin nutrientes añadidos. Al ser una bacteria aerobia requiere un suministro de oxígeno constante.

Tabla 3: Tabla resumen de las condiciones óptimas para el desarrollo de *P. fluorescens*.

Temperatura	27 °C
pH	7
Requerimientos nutricionales	Suministro de carbono, nitrógeno y oxígeno

Su ciclo de vida se basa en la adhesión de una o varias bacterias a la superficie de las raíces de la planta donde se reproducen, dando lugar a una colonia consolidada de grosor y superficie variable desde la que se desprenden células o grupos de células que colonizarán otras partes de la raíz, reiniciando el proceso.

Su acción en la rizosfera se basa en el suministro de nutrientes, en la secreción de antibióticos, en el desarrollo de la colonia y en el control del crecimiento de la planta.

3.2.1.2.2 *Pseudomonas putida*

Bacteria también considerada PGPR presenta cualidades similares a las de *P. fluorescens* en cuanto a su naturaleza y funciones en el suelo, pero tiene una ecología y necesidades propias.

Su rango de temperaturas oscila entre los 4°C y los 40°C, aunque en estos extremos sufre alteraciones en la expresión de sus genes. Soporta un rango de pH más pequeño que otras especies de su género, entre pH 6 y pH 8.

Presenta los mismos mecanismos para la obtención de nutrientes que *P. fluorescens* y, aunque es una especie frugal, sin embargo, necesita un suministro constante de carbono y nitrógeno.

Las condiciones óptimas para el desarrollo de *Pseudomonas putida* se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4: Tabla resumen de las condiciones óptimas para el desarrollo de *P. putida*.

Temperatura	30 °C
pH	7
Requerimientos nutricionales	Suministro de carbono, nitrógeno y oxígeno

El suministro de oxígeno sigue siendo esencial para el desarrollo y la actividad de *P. putida*.

Desarrolla un ciclo de vida idéntico al de *P. fluorescens*, llegando a la raíz, estableciéndose en ella, colonizándola y repitiendo el proceso. *P. putida* mejora la salud del hospedante, mediante el suministro de nutrientes, evita el ataque de patógenos, mediante la ocupación de la raíz y la secreción de antibióticos, desencadena la respuesta defensiva de la planta y controla su desarrollo mediante la secreción de hormonas.

3.2.2 Condicionantes Externos

3.2.2.1 Condicionantes Económicos

Puesto que se pretende vender el producto obtenido es necesario, en lo posible, minimizar los costes de producción y la inversión a realizar en el proyecto, siempre y cuando se asegure el suministro de un producto de calidad que satisfaga los estándares del promotor, los requerimientos del cliente y lo establecido por la normativa vigente.

3.2.2.2 Condicionantes en relación con Infraestructuras

Debido a que el proyecto se llevará a cabo en las instalaciones pertenecientes al promotor, la empresa IDForest-Biotecnología Forestal Aplicada S.L., las dimensiones del proyecto tendrán que adaptarse a estas. Las medidas de la nave en la que se llevará a cabo el proyecto son de 30,62 (L) x 15,00 (An) x 10 (Al) metros, ocupando una superficie de 460 m². El interior se hace accesible gracias a un portón basculante de 5,30 (Al) x 4,90 (An) metros que incorpora una puerta de menor tamaño para el acceso del personal.

Como consecuencia de la situación del proyecto, las instalaciones gozan de canalizaciones para el suministro de agua, tendido eléctrico y comunicaciones preparadas para la circulación de vehículos de gran tonelaje.

3.2.2.3 Condicionantes Tecnológicos

Dado que el diseño y puesta en marcha de la línea de producción requiere la realización de complejos análisis, pruebas y ensayos, la utilización de tecnología capaz de llevar a cabo análisis genéticos, cultivos de microorganismos y seguimientos del desarrollo de poblaciones se vuelve esencial para el desarrollo del proyecto. Los ensayos preliminares serán adaptados a los instrumentos y recursos disponibles en los laboratorios del promotor y de las empresas subcontratadas.

4. SITUACIÓN ACTUAL

En cuanto a la situación medioambiental actual, están surgiendo nuevos fenómenos que amenazan la supervivencia de las masas forestales. Así, la llegada de enfermedades, plagas invasoras, la frecuencia e intensidad de los incendios, el cambio climático y el abandono rural hacen que la resistencia, sanidad y productividad de nuestros bosques y plantaciones forestales se vean seriamente afectadas. Esta situación constituye una inasequible pérdida de los servicios prestados por las masas forestales, poniendo en riesgo el medioambiente y las sociedades actual y futura.

Por otro lado, la necesidad y demanda de medidas que mejoren la situación de las masas forestales y la falta de oferta en el mercado, hacen de este un sector con gran

potencial económico, especialmente en la zona en la que se pretende llevar a cabo, dado que no hay proyectos similares.

5. ALTERNATIVAS DEL PROYECTO

Debido a la naturaleza de nuestro proyecto podemos determinar diversas alternativas en varias fases de este. Así, tanto el análisis genético de las muestras como el diseño del protocolo a seguir o el diseño final de la línea productiva, presentan alternativas que debemos considerar, analizar y aprobar.

Para el análisis y elección de la alternativa a seguir se va a llevar a cabo un análisis multicriterio en el que se describirán las distintas opciones que surgen, se definirán los criterios a utilizar en el análisis y se evaluará cada alternativa con respecto a cada criterio, dándole una puntuación a cada una y, finalmente, eligiendo la que mayor puntuación obtenga.

5.1 ALTERNATIVAS DE LA IDENTIFICACIÓN GENÉTICA

El primer paso para el estudio y ejecución del presente proyecto es la obtención, descripción e identificación precisa de los microorganismos objetivo. Para ello necesitamos llevar a cabo su análisis genético el cual presenta innumerables alternativas que debemos considerar.

Los criterios utilizados para la elección del protocolo finalmente utilizado son los siguientes:

- Criterio 1. Coste: Coste del proceso descrito en cada protocolo
- Criterio 2. Tiempo: Tiempo requerido por cada uno de ellos
- Criterio 3. Experiencia: Experiencia en el proceso
- Criterio 4. Certificación: La obligatoriedad de uso de técnicas específicas para llevar a cabo trabajos de certificación

Estos criterios van a ser aplicados a las fases de extracción y amplificación del material genético (extracción, amplificación).

5.1.1 Extracción y amplificación del ADN

La extracción del ADN es el primer paso a realizar si se quiere llevar a cabo la identificación genética de cualquier organismo. Para ello, es necesario eliminar todas y cada una de las estructuras y moléculas que no sean ADN; consideradas como impurezas. Esto se consigue mediante la aplicación de tratamientos mecánicos y químicos que, progresivamente, eliminan estas impurezas hasta obtener únicamente el material genético del organismo con el que se trabaja.

La extracción del ADN solo se llevará a cabo en las especies de *Trichoderma spp.* debido a que las bacterias, al presentar una estructura y conformación celular más primitiva y con menos compleja, pueden ser sometidas directamente al proceso de amplificación.

Actualmente existen dos alternativas para llevar a cabo este proceso. La primera de ellas (Alternativa 1. Protocolos) son diversos protocolos llevados a cabo con la maquinaria, materiales y productos químicos del laboratorio en el que se trabaje. De esta forma se deben preparar las disoluciones requeridas a mano. La otra alternativa

(Alternativa 2. Kits) es el uso de kits que incorporan todos los materiales necesarios y las instrucciones a seguir para completar la extracción del ADN.

Siguiendo con el punto anterior se va a realizar la elección de la alternativa a aplicar mediante un análisis multicriterio, evaluando los criterios expuestos anteriormente y dándoles un valor que oscila entre 0 y 1, siendo el 0 el valor más desfavorable y el 1 el más favorable, tal y como muestra la Tabla 5.

Tabla 5: Elección final de la alternativa a seguir en la Extracción del ADN.

Alternativa	Coste	Tiempo	Experiencia	Certificación	TOTAL
Protocolos	0,6	0,4	0,8	0,2	2,0
Kits	0,2	0,6	0,6	1	2,4

En el caso de la amplificación del material genético, todas las especies serán sometidas a la técnica conocida como *Polimerase Chain Reaction* (PCR), en la que surgen las mismas alternativas que en el caso anterior; el seguimiento de protocolos completados con los materiales y químicos del propio laboratorio (Alternativa 1), o el uso de kits que incluyen todos los elementos necesarios para completar el análisis (Alternativa 2).

Los criterios a utilizar para la evaluación de ambas alternativas son los mismos que los utilizados para la extracción, de forma que los resultados son los que se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6: Elección final de la alternativa a seguir en la Amplificación del ADN.

Alternativa	Coste	Tiempo	Experiencia	Certificación	TOTAL
Protocolos	0,6	0,3	0,8	0,2	1,9
Kits	0,2	0,7	0,6	1	2,5

Para ambos casos la alternativa elegida es la que se basa en el uso de kits de extracción y amplificación. Esto se debe a su menor duración, a la mayor experiencia del personal con estos kits y a la necesidad de su uso para llevar a cabo trabajos de certificación.

5.2 PROTOCOLO A SEGUIR

Para la consecución de los objetivos del proyecto es esencial definir el protocolo de producción a seguir. Debido a la gran cantidad de factores involucrados en el proceso es imposible determinar los detalles de los protocolos de producción a seguir mediante el análisis multicriterio. Sin embargo, este tipo de análisis se va a utilizar para acotar las posibilidades que surgen en la producción de *Trichoderma spp.* Este análisis no se puede realizar con respecto a *Pseudomonas spp.* ya que no existen alternativas en su caso, por lo que se llevará a cabo la producción en estado líquido. La primera alternativa (Alternativa 1. Producción en sólido) que surge consiste en la producción de los organismos seleccionados en estado sólido, utilizando como sustrato cereales sobre los que se desarrollen los hongos y bacterias; mientras que la segunda alternativa (Alternativa 2. Producción en líquido) consiste en la producción de estos organismos en medios líquidos, en el interior de equipos especialmente diseñados para este propósito.

Los criterios por los que se evaluará y elegirá una de las alternativas son los siguientes:

- Criterio 1. Coste: El coste económico del proceso productivo
- Criterio 2. Tiempo: El tiempo requerido para la consecución de la producción
- Criterio 3. Calidad: La calidad final del producto.

Tras llevar a cabo el estudio de cada alternativa, se obtuvieron los resultados mostrados en la Tabla 7.

Tabla 7: Elección final de la alternativa a seguir en el tipo de protocolo de producción.

Alternativa	Coste	Tiempo	Calidad	TOTAL
Producción en sólido	0,9	0,2	0,3	1,9
Producción en líquido	0,2	0,7	0,8	2,5

La alternativa a seguir es la del diseño de protocolos de producción en estado líquido, que presentan grandes ventajas en cuanto a la calidad final obtenida y a su duración. Sin embargo, para ampliar el conocimiento sobre las cepas con las que se trabaja se llevará a cabo una experiencia en estado sólido.

5.3 FORMULACIÓN

Una vez completada la producción en masa se debe decidir cómo se conserva y presenta el producto. La alternativa a seguir determinará el periodo de conservación y la pureza final del producto. En este caso surgen tres alternativas. La primera de ellas (Alternativa 1. Liofilización) consiste en el liofilizado del producto, eliminando toda su humedad. La segunda alternativa (Alternativa 2. Centrifugado) consiste en el centrifugado, por el que se elimina buena parte del medio de cultivo, pero no todo ello. La tercera y última alternativa (Alternativa 3. No formulación) consiste en no llevar a cabo la formulación del producto.

Los criterios con los que se evaluará las alternativas son los siguientes:

- Criterio 1. Coste: Coste del proceso
- Criterio 2. Viabilidad: Periodo de viabilidad del producto con cada formulación
- Criterio 3. Pureza: Pureza final del producto
- Criterio 4. Manipulación: Modificaciones a realizar previamente a la aplicación

Los resultados finales son los mostrados en la Tabla 8.

Tabla 8: Elección final de la alternativa a seguir en la formulación de *Trichoderma spp.*

Alternativa	Coste	Viabilidad	Pureza	Manipulación	TOTAL
Liofilización	0,2	0,8	0,9	0,5	2,4
Centrifugado	0,3	0,5	0,5	0,6	1,9
No formulación	0,9	0,2	0,4	0,7	2,2

El método de formulación a seguir es la liofilización, debido a la mayor conservación de la viabilidad del producto y a la mayor pureza del mismo. Al igual que en el caso anterior,

Alumno: Rodrigo Herrera Sanz

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (CAMPUS DE PALENCIA). E.T.S. de Ingenierías Agrarias

Titulación: Grado en Ingeniería Forestal y del Medio Natural

este análisis solo se llevará a cabo con respecto a *Trichoderma spp.* ya que solo el liofilizado, entre todas las alternativas consideradas es apto para *Pseudomonas spp.*

5.4 ELECCIÓN DE LA MAQUINARIA

En la elección de la maquinaria se va a determinar el tipo de equipos a utilizar en los procesos de producción en masa y en la formulación.

Con respecto a la producción en masa surgen dos alternativas. La primera de ellas (Alternativa 1. SIP) es la utilización de un sistema de biofermentación equipado con un sistema de esterilización en el lugar (SIP) a base de vapor de agua; mientras que la segunda (Alternativa 2. Manual) se basa en la utilización de un sistema de biofermentación de esterilización manual.

Los criterios por los que se evaluarán ambas alternativas son los siguientes:

- Criterio 1. Coste: Coste del sistema de biofermentación
- Criterio 2. Rendimiento: Rendimiento del biorreactor
- Criterio 3. Complejidad: Complejidad del sistema

Los resultados del análisis se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9: Elección del sistema de biofermentación a utilizar

Alternativa	Coste	Rendimiento	Complejidad	TOTAL
SIP	0,5	0,8	0,6	1,9
Manual	0,7	0,4	0,7	1,8

De esta forma la alternativa a seguir es la utilización de sistemas SIP, que mejoran el rendimiento.

Con respecto a los sistemas de liofilización surgen dos alternativas. La primera (Alternativa 1. *Batch*) consiste en la utilización de los sistemas por lotes, conocidos como *Batch*, que no requieren el posterior empaquetado. La segunda alternativa (Alternativa 2. *Bulk*) consiste en el uso de sistemas a granel, conocidos como "*Bulk*", que requieren empaquetar el producto tras la liofilización.

Los criterios utilizados en la evaluación son los siguientes:

- Criterio 1. Coste: Coste de adquisición, mantenimiento y utilización del sistema
- Criterio 2. Calidad: La calidad final del producto

Los resultados del análisis se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10: Elección del sistema de liofilización

Alternativas	Coste	Calidad	TOTAL
<i>Batch</i>	0,3	0,9	1,2
<i>Bulk</i>	0,7	0,7	1,4

La alternativa elegida es la segunda, por lo que la formulación se llevará a cabo con un sistema de liofilización *Bulk*.

5.5 EFECTO DE LAS ALTERNATIVAS SOBRE LOS OBJETIVOS DEL PROYECTO

Debido a que las alternativas analizadas y elegidas modifican el coste, rendimiento resultado final del proceso productivo y de las fases de las que se compone, el proyecto va a verse modificado ligeramente. Estas modificaciones se van a ver traducidas principalmente en la maquinaria y equipos a utilizar, siendo estos más sofisticados. De cualquier forma, las alternativas finalmente seleccionadas aseguran que se alcanzan los objetivos del proyecto.

6. INGENIERÍA DEL PROYECTO

6.1 PROTOCOLO DE PRODUCCIÓN

El protocolo de producción es un elemento esencial del proyecto debido a que determina el modo en el que se desarrolla la producción y, por tanto, influye directamente en la calidad del producto obtenido. Siguiendo la alternativa elegida anteriormente, se ha diseñado un protocolo de producción en estado líquido para ambos tipos de organismos que consta de tres fases, diferenciándose en las condiciones en las que se llevan a cabo. Estas tres fases son las siguientes:

- Fase I. Formación del inóculo: En ella se produce la primera colonia del hongo y/o bacteria a producir, precursora de las producidas durante la siguiente fase. Al inicio de esta fase se producirá un inóculo en medio sólido con el que se iniciará el proceso.
- Fase II. Producción en masa: La colonia formada durante la primera fase crece y se desarrolla, multiplicándose en masa hasta alcanzar el número de propágulos (hongos) y unidades formadoras de colonia (bacterias) deseado.
- Fase III. Formulación: Tras la producción del organismo se trata y prepara para el empaquetado y conservación.

6.2 DEFINICIÓN DE LA LÍNEA DE PRODUCCIÓN

Los equipos que componen la línea de producción deben ser capaces de cumplir con el protocolo de producción, además de con las alternativas elegidas anteriormente. La línea de producción se compone de dos ramas, una centrada en *Trichoderma spp.* y la otra centrada en *Pseudomonas spp.*, que comparten componentes comunes. Los equipos utilizados se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11: Equipos utilizados en cada fase del proceso productivo.

Fase	Equipo	Observaciones
Fase I	Autoclave Celitron A-456	Uso común
	Biorreactor Bionet F1 MB-3	Uso común
	Fregadero/cuba de acero inoxidable	Uno para cada línea
	Garrafas esterilizables	Uso común
Fase II	Biorreactor Bionet F2 MB-30	Uso exclusivo de <i>Pseudomonas spp.</i>

	Biorreactor Bionet F3 MB-100	Uso exclusivo de <i>Trichoderma spp.</i>
Fase III	Sistema de liofilización Kemolo FD-50	Uso común
	Cámara frigorífica polar max Impafri 176x136	Uso común
	Bandejas Teclen® Lyoprotect®	Uso común
	Carro de servicio de acero inoxidable	Uno para cada línea

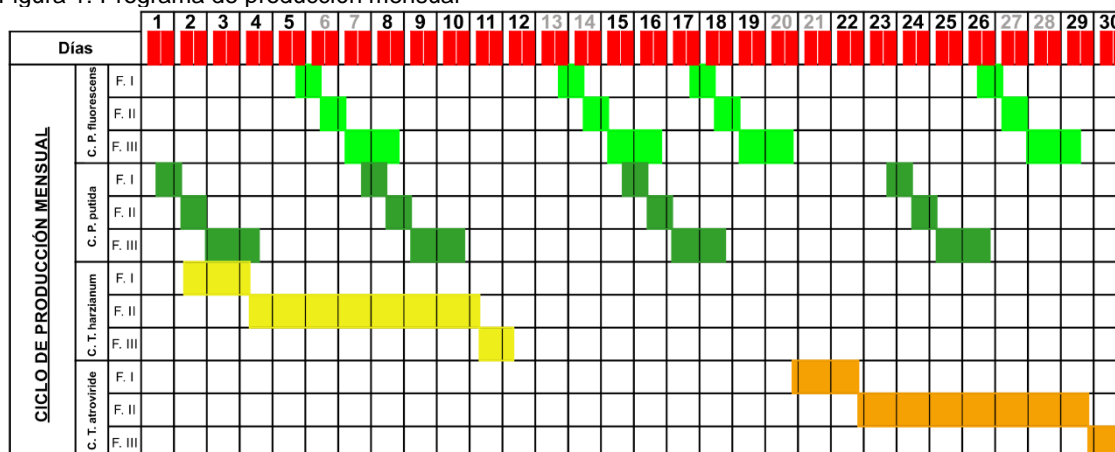
De esta forma, con los equipos elegidos y los protocolos de producción a seguir, se espera alcanzar una producción mensual de 55,69 litros de solución de *T. harzianum*, 50,58 litros de *T. atroviride*, en un único ciclo productivo y generando $1,15 \times 10^{13}$ propágulos de *Trichoderma spp.* De la misma forma, se espera producir cada mes 106,68 litros de *P. fluorescens* y 57,80 litros de *P. putida*, divididos en cuatro ciclos productivos y generando un total de $6,42 \times 10^{12}$ unidades formadoras de colonia de *Pseudomonas spp.*

6.3 PROGRAMA PRODUCTIVO

Para la definición del programa productivo se va a tomar como unidad de referencia el periodo mensual. Para alcanzar la producción deseada, se debe completar un único ciclo productivo de cada especie de *Trichoderma spp.* y cuatro ciclos de cada especie de *Pseudomonas spp.* Estos, al compartir equipos deben coordinarse de forma que se puedan completar los ciclos sin pausas ni interrupciones. Además, en el diseño y organización del ciclo productivo, se han intentado evitar, en la medida de lo posible, los trabajos durante días festivos y fines de semana.

Con todos estos criterios se ha definido el programa de producción que se muestra en la Figura 1.

Figura 1: Programa de producción mensual

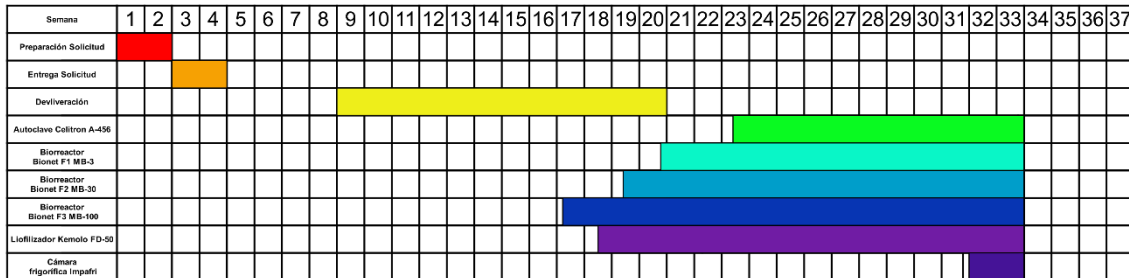


- Legenda
- Ciclo P. fluorescens
 - Ciclo P. putida
 - Ciclo T. harzianum
 - Ciclo T. atroviride
 - Jornadas de trabajo

6.4 PROGRAMACIÓN DE LA EJECUCIÓN Y PUESTA EN MARCHA DEL PROYECTO

En la puesta en marcha del proyecto se va a seguir lo indicado en la Figura 2. En ella, se muestra el cronograma para la programación y puesta en marcha del proyecto, para cuyo diseño se han tenido en cuenta el tiempo para completar los trámites administrativos exigidos por la normativa vigente y el tiempo que se estima necesario para la construcción e instalación de los equipos a adquirir. Todo ello se ha organizado tomando como referencia el momento óptimo de aplicación de los productos, establecido en el inicio de la primavera (semana 37 del cronograma).

Figura 2: Cronograma de para la programación y puesta en marcha del proyecto



Leyenda

- Preparación de la solicitud
- Entrega de la solicitud de registro
- Deliberación de la solicitud
- Construcción y entrega del liofilizador FD-50
- Construcción y entrega de la cámara frigorífica
- Construcción y entrega del biorreactor F3 MB-100
- Construcción y entrega del biorreactor F2 MB-30
- Construcción y entrega del biorreactor F1 MB-3
- Construcción y entrega del autoclave A-456

7. NORMAS PARA LA EXPLOTACIÓN DEL PROYECTO

Una vez se ha llevado a cabo el objetivo del proyecto, es decir, el diseño de la línea de producción y de los protocolos de producción para su posterior explotación, se iniciará la explotación del proyecto, mediante la producción de los hongos y bacterias seleccionados. Para asegurar y alcanzar la producción para la que la línea ha sido diseñada, se deben cumplir las siguientes normas:

- Los ciclos de producción deben completarse sin pausas, interrupciones o retrasos; en caso contrario, no será posible mantener las condiciones óptimas, lo que afectará al desarrollo y multiplicación de los organismos objetivo, disminuyendo el rendimiento del proceso.
- Debe mantenerse el mayor grado de esterilidad posible, esterilizando de forma apropiada los equipos y materiales utilizados tras su uso. De esta forma se evitan posibles contaminaciones producidas por los distintos organismos a producir o por otros ajenos a la línea de producción (otros géneros de hongos y bacterias) y, así se garantiza la calidad del producto final.
- La producción de *Trichoderma spp.* y *Pseudomonas spp.* debe ser llevada a cabo por trabajadores con formación y experiencia en la producción y manipulación de microorganismos de esta o similar naturaleza. El número de trabajadores necesario se establece en cuatro profesionales.

- Tras la formulación y empaquetado, el producto debe ser conservado a las condiciones de humedad (<20 %) y temperatura (4 °C) establecidas, para garantizar la viabilidad del producto hasta la fecha de caducidad, establecida en tres meses.
- Los materiales utilizados frecuentemente deberán ser sustituidos cuando pierdan las características que los hacen aptos para su uso. Este periodo de utilización previo a la sustitución, variará dependiendo del material, de su importancia en el proceso productivo y de los esfuerzos a los que se somete.

8. PRESUPUESTO DEL PROYECTO

La información detallada del coste del proyecto se puede encontrar en el anejo X. JUSTIFICACIÓN DE PRECIOS, en el Documento 4. MEDICIONES y en el Documento 5. PRESUPUESTOS.

El presupuesto del proyecto se divide en tres capítulos, diferenciados por su naturaleza y objetivos. Estos a su vez se dividen en epígrafes, más específicos y centrados en los procesos, unidades, que se llevan a cabo dentro de cada capítulo. Estas unidades han sido presupuestadas teniendo en cuenta el coste de los materiales, de la mano de obra y de la maquinaria utilizada, así como las unidades de obra necesarias para la consecución del proyecto. También se han tenido en cuenta los medios auxiliares que se estiman necesarios y los costes indirectos surgidos. De esta forma los presupuestos parciales son los siguientes:

-El presupuesto del CAPÍTULO. I. TRABAJOS PREVIOS, asciende a CUATROCIENTOS DIECINUEVE EUROS Y CUARENTA Y UN CÉNTIMOS (419,41 €)

-El presupuesto del CAPÍTULO. II. LÍNEA DE PRODUCCIÓN, asciende a TRESCIENTOS NOVENTA Y SIETE MIL QUINIENTOS TRECE EUROS Y CUATRO CÉNTIMOS (403210,29 €)

-El presupuesto del CAPÍTULO. III. SEGURIDAD Y SALUD, asciende a QUINIENTOS CUARENTA Y DOS EUROS Y NOVENTA Y OCHO CÉNTIMOS (542,98 €)

A estos presupuestos parciales hay que añadir el coste de los equipos de protección y seguridad no incluidos en el presupuesto (493,38 €).

-El Presupuesto de Ejecución de Material asciende a CUATROCIENTOS CUATRO MIL QUINIENTOS CINCUENTA Y CUATRO EUROS Y DIECISIETE CÉNTIMOS (404666,05 €)

-El Presupuesto de Ejecución por Contrata del presente proyecto, denominado "Proyecto de diseño de una línea de producción de hongos y bacterias para la mejora de suelos forestales", asciende a QUINIENTOS OCHENTA Y DOS MIL SEISCIENTOS SETENTA Y OCHO EUROS Y SESENTA Y CINCO CÉNTIMOS (582678,65 €)

9. EVALUACIÓN INTERNA DEL PROYECTO

9.1 VIDA ÚTIL DEL PROYECTO

Durante la construcción y diseño del proyecto se ha decidido que su vida útil, el periodo de explotación, sea de quince años. Esta decisión se ha tomado por las siguientes razones:

-La maquinaria y los equipos utilizados, incluso siguiendo los protocolos de mantenimiento y revisiones necesarias, presentan una pérdida de rendimiento pasado este periodo de tiempo por lo que, más allá de los 15 años, la viabilidad económica del proyecto puede verse amenazada.

-Siguiendo las previsiones de desarrollo del mercado de los biofertilizantes (en los que se encuadran los productos que nos ocupan) para los próximos años, la demanda del mercado dentro de 15 años se habrá multiplicado, de forma que, si se continuara con la explotación, no se podrían satisfacer las necesidades del mercado.

-Es tiempo más que suficiente para la recuperación de la inversión y la obtención de beneficios, además de considerarse como el momento adecuado para replantearse la naturaleza de la actividad. Debido al avance previsible de la ciencia y tecnología puede considerarse la producción de otras especies cuyo rendimiento económico sea mayor o que presenten mejores características que las consideradas en el presente proyecto.

9.2 PLAN FINANCIERO

Debido a la fuerte inversión a realizar en equipos, maquinaria y materiales, junto a la necesidad de realizar esta inversión de una vez, sin plazos, es necesario buscar líneas de financiación en forma de créditos y/o subvenciones que permitan poner en marcha el proyecto. Dado que no existen subvenciones que se puedan solicitar para el presente proyecto y dentro del programa establecido, se recurrirá a la solicitud de un crédito al Instituto de Crédito Oficial (ICO) por valor del 72,5 % del proyecto, 293278,17 €, haciéndose el promotor responsable del resto del coste del proyecto. Este crédito se otorga sin carencia de tiempo, para ser reembolsado a los 8 años y con un interés fijo del 4,346 %.

9.3 BENEFICIOS Y COSTES DEL PROYECTO

Debido a la naturaleza del proyecto se definen dos etapas o fases con respecto a los beneficios y costes. La primera de ellas se extiende desde el inicio del proyecto hasta la entrega y puesta en marcha de la línea productiva. En ella únicamente se producen costes, en forma de costes de adquisición de maquinaria y equipos, materiales e infraestructuras, de forma que coincide con el PEM y constituyendo un coste de 404666,05 €. La segunda fase se extiende desde el inicio de la producción hasta el fin de la vida útil del proyecto. En ella se producen cobros, provenientes de la venta de los productos conforme al precio fijado y a la venta de equipos obsoletos, y costes, en forma de labores de mantenimiento, pago de salarios y seguros y renovación de equipos.

El balance de cobros y gastos se analiza en profundidad en el anejo IX. VIABILIDAD Y COMPETENCIA del presente proyecto, dando lugar al balance que se muestra en la Tabla 12.

Tabla 12: Balance anual de cobros y gastos

AÑO	Balance (€)
0	-111387,88
1	39851,79
2	39071,31
3	34356,53
4	-3,87
5	39806,96
6	33576,05
7	37851,79
8	-1419,97
9	78548,24
10	83218,19
11	84043,50
12	38692,58
13	84043,50
14	83263,02
15	78503,41

El balance final del proyecto es positivo, recuperando la inversión y obteniendo beneficios al final de su vida útil.

9.4 EVALUACIÓN ECONÓMICA DEL PROYECTO

Para la evaluación objetiva de los resultados económicos del proyecto se han utilizado los índices de rentabilidad VAN, Pay-back y la relación Beneficio-Coste.

-El VAN, se ha calculado a partir de los flujos de caja anuales, de la inversión inicial y del interés, fijado en un 5%. El resultado final (370648), al ser muy superior a cero indica que el proyecto presenta una rentabilidad alta.

-El Pay-back indica que la inversión inicial se recuperará el quinto año de explotación, de forma que, la inversión inicial y hasta el tercer año, la empresa promotora deberá cubrir los gastos del proyecto.

-La relación Beneficio-Coste, una vez actualizados los costes e ingresos tomando como tasa de actualización un 5 %, adquiere un valor de 1,08. Esto indica que se recuperará la inversión inicial y que el proyecto aportará un rendimiento al promotor del 8 %, haciendo rentable el proyecto.

9.5 EVALUACIÓN SOCIAL

Los efectos sociales del presente proyecto pueden considerarse como positivos, aportando un beneficio a la sociedad de dos formas diferentes:

-Los efectos inmediatos del proyecto sobre el entorno socio-económico se basan en la creación de actividad económica, generando puestos de trabajo directos e indirectos, riqueza y fijando población en una zona que, si bien no es de las más afectadas por el fenómeno de la despoblación rural, también sufre sus consecuencias.

-Los efectos indirectos del proyecto sobre el entorno en el que se lleva a cabo se basan en su impacto en el medioambiente. Los organismos producidos reducirán la aplicación de fertilizantes y pesticidas químicos, llegando incluso a sustituirlos. De esta forma el estado general medioambiental mejorará, teniendo un impacto positivo sobre la sociedad.

9.6 EVALUACIÓN AMBIENTAL

Siguiendo lo dictaminado por la normativa actual se ha desarrollado un estudio básico de impacto ambiental para el presente proyecto, en el que se analizan y evalúan los efectos de las distintas acciones y trabajos a completar sobre el medioambiente.

El balance general del proyecto se puede considerar como positivo, ya que los daños y alteraciones que se pueden causar al medioambiente son leves y se consideran compensados por los servicios que aporta a posteriori.

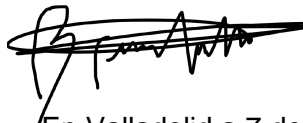
Las alteraciones y daños que puedan producirse se concentran en la fase de conformación de la línea de producción, momento en el que pueden producirse vertidos de sustancias perjudiciales para el medioambiente, por lo que en el Anejo VII. Estudio de Impacto Ambiental se han definido las normas y reglas a seguir para minimizar estos daños.

10. ORDEN Y PRIORIDAD DE DOCUMENTOS

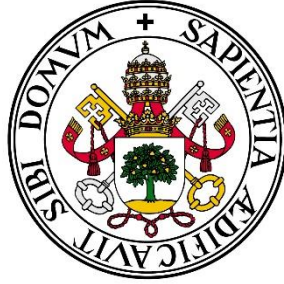
Los documentos que componen el proyecto contienen la información necesaria para su descripción, funcionamiento y puesta en marcha. Cada uno de ellos se centra en aspectos específicos del proyecto, aunque tratan con la misma información. De esta forma y para facilitar la comprensión del proyecto, se determina la jerarquía de los distintos documentos que componen el proyecto de la siguiente forma:

1. Documento N°2. PLANOS
2. Documento N°3. PLIEGO DE CONDICIONES
3. Documento N°5. PRESUPUESTOS
4. Documento N°4. MEDICIONES
5. Documento N°1. MEMORIA

FDO. RODRIGO HERRERA SANZ



En Valladolid a 7 de junio de 2020



Universidad de Valladolid

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍAS AGRARIAS

Grado en Ingeniería Forestal y del Medio Natural

Proyecto de diseño de una línea de producción de hongos y bacterias para la mejora de suelos forestales.

ANEJOS A LA MEMORIA

ANEJO I: DESCRIPCIÓN *Trichoderma* *spp.* y *Pseudomonas spp.*

Índice del Anejo I

1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVO	1
3. <i>TRICHODERMA SPP.</i>	1
3.1 <i>TRICHODERMA HARZIANUM</i>	1
3.1.1 Taxonomía	2
3.1.2 Ecología	3
3.1.3 Medio de cultivo	3
3.1.4 Ciclo de vida	4
3.1.5 Acción en la rizosfera	4
3.2 <i>TRICHODERMA ATROVIRIDE</i>	5
3.2.1 Taxonomía	5
3.2.2 Ecología	5
3.2.3 Medio de cultivo	6
3.2.4 Ciclo de vida	7
3.2.5 Acción en la rizosfera	7
4. <i>PSEUDOMONAS SPP.</i>	8
4.1 <i>PSEUDOMONAS FLUORESCENS</i>	8
4.1.1 Taxonomía	8
4.1.2 Ecología	9
4.1.3 Medio de cultivo	9
4.1.4 Ciclo de vida	10
4.1.5 Acción en la rizosfera	10
4.2 <i>PSEUDOMONAS PUTIDA</i>	11
4.2.1 Taxonomía	12

ANEJO I: DESCRIPCIÓN DE LOS ORGANISMOS

4.2.2 Ecología	12
4.2.3 Medio de cultivo	12
4.2.4 Ciclo de vida	13
4.2.5 Acción en la rizosfera	13

1. INTRODUCCIÓN

En cualquier proceso productivo el conocimiento de las materias primas y del producto final es esencial. Las razones por la que se llevan a cabo las distintas fases del proceso productivo solo se comprenden cuando el conocimiento de las materias primas y las técnicas utilizadas es completo.

Con respecto al presente proyecto, las materias primas y los productos finales, son organismos vivos que deben ser estudiados y analizados. Todo ello hace que el estudio de *T. harzianum*, *T. atroviride*, *P. fluorescens* y *P. putida* sea una parte importante en el proyecto.

Por ello, el presente anejo se centra en el estudio y recopilación de información de estos microorganismos.

2. OBJETIVO

El objetivo que se pretende alcanzar en este apartado es el conocer y comprender la taxonomía, la ecología, el ciclo de vida y la acción y comportamiento de las especies objetivo en el suelo.

3. TRICHODERMA SPP.

El género *Trichoderma spp.* engloba un amplio catálogo de especies de hongos que presentan características comunes. Las especies de este género son hongos presentes en el suelo, pertenecientes a la división ascomicetos (A. Schuster & M. Schmoll. 2010), que se encuentran en diversas partes del mundo.

Destacan por actuar en la rizosfera como micoparásitos y fungicidas que establecen relaciones mutualistas con las plantas, eliminando posibles hongos patógenos y desencadenando una respuesta defensiva de la planta. Sin embargo, también actúan como hongos saprófitos, consumiendo la materia orgánica muerta (Ahmad and Baker 1987 a, b).

Además de su potencial como controladores biológicos, ciertas especies también destacan por su alta y efectiva producción de enzimas celulóticas y hemicelulóticas, lo que hace que presenten un gran potencial para diversas industrias (A. Schuster & M. Schmoll. 2010).

3.1 TRICHODERMA HARZIANUM

El caso específico de *Trichoderma harzianum* es algo peculiar, ya que puede ser considerada una especie agregada debido a que, desde su descripción y debido a la falta de aplicación de técnicas moleculares de identificación, diversas especies del mismo género se han considerado como *Trichoderma harzianum*.

Además, este error en la identificación no se ha podido corregir debido a que no se tiene acceso a las cepas originalmente utilizadas para su determinación. Así, actualmente esta especie engloba 14 subespecies repartidas por todo el mundo y en distintos hábitats, tal y como se muestra en la Tabla 1.

ANEJO I: DESCRIPCIÓN DE LOS ORGANISMOS

Tabla 1: Relación de subespecies englobadas bajo el nombre *Trichoderma harzianum* (P. Chaverri et al. 2015)

Especie	Distribución	Hábitat
<i>T. afarasin</i>	Oeste África	Endófito/Suelo
<i>T. afroharzianum</i>	Cosmopolita	Diverso
<i>T. atrobrunneum</i>	Europa/Norteamérica	Suelo, hongos y madera muerta
<i>T. camerunense</i>	Oeste África	Suelo
<i>T. endophyticum</i>	Ecuador/Perú	Endófito
<i>T. guizhouense</i>	Cosmopolita	Diverso. Endófito/Suelo
<i>T. harzianum</i>	Europa/ Norteamérica	Suelo y Endófito
<i>T. inhamatum</i>	Neotropical	Suelo
<i>T. lentiforme</i>	Neotropical	Endófito, etapas sexuales en corteza y hojas
<i>T. lixii</i>	Sudeste Asiático	Afiloforales
<i>T. neutropicale</i>	Ecuador/Perú	Endófito
<i>T. pyramidale</i>	Sur Europa	Madera y corteza
<i>T. rifaii</i>	Neotropical	Endófito
<i>T. simmonsii</i>	Europa/ Norteamérica	Madera en descomposición

Estas 14 subespecies presentan ciertas diferencias con respecto a la distribución, hábitat y ciertos metabolitos. Estas diferencias unidas a la importancia comercial del género en la industria, hace que sea necesaria la correcta identificación de la subespecie con la que se trabaja, entendiéndose como subespecie cualquier orden de clasificación inferior a la especie.

Como producto objetivo de este proyecto, la descripción detallada de *T. harzianum* es importante para alcanzar los objetivos marcados.

3.1.1 Taxonomía

Debido a la gran diversidad y complejidad del género, la identificación y definición taxonómica de sus miembros no es sencilla. Existen especies agregadas (grupos de especies estrechamente relacionadas entre sí, que se tratan como una única especie para ciertos propósitos), subespecies, variedades y cepas que hay que tener en cuenta en la clasificación de los miembros del género. Por ello, tras la realización de diversos análisis morfológicos y químicos, Rifai en 1969 definió la taxonomía completa de *T.harzianum* (fase anamorfa de *Hypocrea lixii*), que se encuentra resumida en la Tabla 2.

Tabla 2: Taxonomía completa de *Trichoderma harzianum*. (Fuente: NCBI)

Reino	<i>Fungi</i>
Filo	<i>Ascomycota</i>
Subfilo	<i>Pezizomycotina</i>
Clase	<i>Sordariomycetes</i>
Subclase	<i>Hypocreomycetidae</i>
Orden	<i>Hypocreales</i>
Género	<i>Trichoderma</i>
Especie	<i>Trichoderma harzianum</i>

3.1.2 Ecología

T. harzianum al igual que gran parte de las especies de su género, es un hongo que se puede encontrar en suelo. Muestra una gran adaptabilidad a las condiciones del medio, siendo capaz de prosperar en condiciones con gran falta de nutrientes. Esto se debe a su capacidad para regular su crecimiento, su metabolismo y su reproducción.

También destaca por su capacidad para prosperar incluso en condiciones de total oscuridad, solo viéndose afectada la capacidad para producir conidios.

Debido a esta gran adaptabilidad, resulta algo complicado definir la ecología de este hongo. Sin embargo, se puede definir un rango de temperaturas en el que el crecimiento y la producción de conidios tienen lugar. Ciertos estudios indican que entre los 20 y 40 grados centígrados el hongo es capaz de producir nuevo tejido y estructuras, desarrollando un crecimiento óptimo a los 27 °C (L. Soesanto et al. 2011).

De la misma forma es capaz de sobrevivir en un amplio rango de pH, que oscila entre 4 y 8, pero muestra un desarrollo óptimo en pH ligeramente ácidos entorno 6-6,5.

Muestra gran resistencia frente a la falta de nutrientes debido a su capacidad, común al resto de los miembros del género, para producir sideróforos que le permiten solubilizar y utilizar nutrientes inaccesibles para otros organismos. Sin embargo, requiere de fuentes constantes de carbono y nitrógeno con una ratio óptima de 10/1 C/N (A.Q. Rajput, M.A. Khanzada & S. Shahzad. 2014).

3.1.3 Medio de cultivo

Debido a que el principal objetivo del proyecto es la producción de este hongo debido a sus propiedades y efecto sobre la rizosfera, la determinación de los mejores medios de cultivo es vital.

Tras la comparación y experimentación con diversos medios de cultivo (N. Jahan et al. 2018) se puede determinar que el medio más adecuado para el cultivo y crecimiento de *T. harzianum* es la patata dextrosa agar (PDA), que da lugar a un crecimiento más alto y a un peso tanto en fresco como seco notablemente superior al conseguido en el resto de medios utilizados.

Además, la estructura de los tejidos producidos también difiere entre los distintos medios. De esta forma con la PDA se obtienen hifas más gruesas, mientras que otros medios, como el agua agar, dan lugar a hifas más finas (N. Jahan, et al. 2018)

Sin embargo, también se desarrolla con facilidad en otros medios como Extracto de Malta Agar (MEA) y Czapek Agar.

Tabla3: Composición de los posibles medios de cultivo de *T.harzianum*.

Medio	Composición
PDA/PDB (Potato Dextrose Agar/ Potato Dextrose Broth)	-20 g Dextrosa -15 g Agar -4 g Almidón de patata -1 l Agua destilada
MEA (Malt Extract Agar)	-20 g Extracto de malta -20 g Dextrosa -6 g Peptona -15 g Agar

ANEJO I: DESCRIPCIÓN DE LOS ORGANISMOS

CZA (Czapek Agar)	-30 g Sacarosa -2 g NaNO ₃ -1 g K ₂ HPO ₄ -0,5 g MgSO ₄ -0,5 g KCl -0,01 g FeSO ₄ -15 g Agar
--------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

3.1.4 Ciclo de vida

Los hongos del género *Trichoderma spp.*, *T. harzianum* incluido, presentan el ciclo de vida adaptado a la fase asexual de los ascomicetes, de forma que solo ciertas especies presentan el ciclo sexual.

Además, este ciclo se presenta acelerado con respecto a otros géneros, en una escala de tiempo de semanas o meses.

T. harzianum lleva a cabo únicamente la reproducción asexual a través de conidios, células haploides circulares como se muestra en la Figura 1, que son liberadas al medio generando un nuevo micelio y un nuevo individuo genéticamente idéntico.

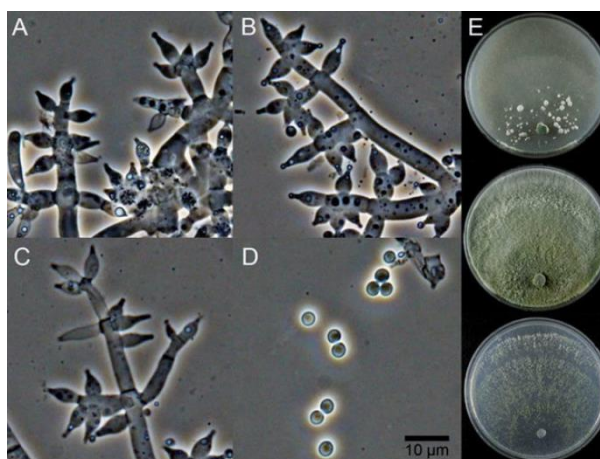


Figura 1: Imagen de los conidióforos (A-C) y los conidios (D) producidos por *T.harzianum*. S.Jang et al. 2018. "New Report of Three Unrecorded Species in *Trichoderma harzianum* Species Complex in Korea".

3.1.5 Acción en la rizosfera

Debido a la abundante investigación sobre *T. harzianum* y el resto de especies del género, se tiene un amplio conocimiento de su efecto en la rizosfera y en la planta.

Como ya se ha explicado *T. harzianum* puede ser considerado como un agente bioprotector que elimina ciertas especies patógenas para la planta, además de inducir la respuesta defensiva de la propia planta.

La efectividad del hongo como control biológico dependerá en gran medida de factores abióticos, como el pH, la luz o las heridas mecánicas (A. Schuster & M. Schmoll. 2010).

Como fungicida es capaz de eliminar a otros hongos, entre los que se encuentran especies patógenas para la planta.

ANEJO I: DESCRIPCIÓN DE LOS ORGANISMOS

En un primer momento *T. harzianum* detecta la presencia de otro hongo gracias a la secreción de moléculas, entre las que se encuentran enzimas degradadoras de la pared celular y exoquitinasas (G.E. Harman et al. 2004). Estas liberan oligómeros de la pared celular del hongo objetivo, indicando su posición, de forma que *T. harzianum* crece hacia el objetivo. Al mismo tiempo la detección de estos oligómeros induce la secreción de compuestos fungitóxicos, que empiezan a degradar los tejidos del objetivo antes de que se establezca contacto. Una vez que *T. harzianum* alcanza el objetivo, este se aferra a él mediante uniones entre lectinas y carbohidratos de ambas paredes celulares. En ese momento se produce peptaibol y diversas enzimas degradadoras de la pared celular, permitiendo el acceso al lumen del hongo objetivo.

T. harzianum también es capaz de desencadenar y estimular los protocolos defensivos de la planta hospedante. Esto se produce por la liberación de ciertas moléculas que activan esta respuesta defensiva. Principalmente son tres los compuestos que inician estos procesos (G.E. Harman et al. 2004.):

- Oligosacáridos y otras moléculas con bajo peso molecular
- Proteínas enzimáticas y otros compuestos naturaleza similar
- Otras proteínas, activadas por genes de avirulencia

3.2 TRICHODERMA ATROVIRIDE

Como miembro del género *Trichoderma spp.* presenta las características propias de este grupo. *T. atroviride* es un hongo filamentosos que se encuentra en el suelo, en el ámbito de la rizosfera, estableciendo relaciones mutualistas con las raíces de las plantas hospedantes. Esto hace que su valor como biofertilizante y biofungicida sea muy valorado.

3.2.1 Taxonomía

Al igual que el resto de especies del mismo género, *T. atroviride* presenta una fase sexual (teleomorfa) llamada *Hypocrea atroviridis*, muy poco común debido a que los miembros de este género completan su ciclo de vida principalmente en la fase asexual. De esta forma y a partir de la comparación morfológica y el análisis químico de las distintas especies, P. Karst en 1892 definió la clasificación taxonómica de *T. atroviride*, que se muestra en la Tabla 3.

Tabla 4: Taxonomía completa de *Trichoderma atroviride* (P.Karst. 1892) (Fuente: NCBI)

Reino	<i>Fungi</i>
Filo	<i>Ascomycota</i>
Subfilo	<i>Pezizomycotina</i>
Clase	<i>Sordariomycetes</i>
Subclase	<i>Hypocreomycetidae</i>
Orden	<i>Hypocreales</i>
Género	<i>Trichoderma</i>
Especie	<i>Trichoderma atroviride</i>

3.2.2 Ecología

Como en el resto de hongos y de las especies englobadas en mismo género, el crecimiento y desarrollo de *T. atroviride* van a estar condicionados por factores abióticos

ANEJO I: DESCRIPCIÓN DE LOS ORGANISMOS

como la luz, el pH, la temperatura, el oxígeno disponible y la presencia y disponibilidad de nutrientes en la rizosfera. Debido a la influencia de estos factores en el desarrollo y comportamiento de la especie que nos ocupa, su influencia debe ser estudiada y comprendida de forma que se puedan controlar estas condiciones en beneficio del proyecto.

Al igual que otras especies de su género, *T. atroviride* es capaz de soportar y sobrevivir en un rango de temperaturas relativamente amplio, entre los 12 y los 35 °C. Sin embargo, el rango de temperaturas más adecuado para su crecimiento se establece entre los 20 y los 30 °C, alcanzando el crecimiento máximo a 25 °C (M. Shahid et al. 2014). Bien es cierto que la producción de biomasa es máxima a los 25°C, sin embargo, la diferencia con la biomasa formada a 30 °C es muy pequeña, por lo que se podría considerar que, dependiendo del resto de factores que influyen en el desarrollo del hongo, la temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre los 25 y los 30 °C.

Al igual que con la temperatura *T. atroviride* puede desarrollarse y sobrevivir en un rango de pH amplio, que abarca tanto pH ácidos con un pH 4, como básicos con un pH 8. Si bien es cierto que el crecimiento, desarrollo y ciclo de vida se ven alterados en los valores extremos. El crecimiento óptimo se alcanza en un pH 6 y se mantiene hasta pH 6,5, a partir del cual disminuye hasta ser prácticamente nulo en pH superiores. Además del crecimiento, el pH también afecta la conidiación del hongo de forma que, con pH ácidos, pH<4,4, la conidiación se ve estimulada.

Existen otros factores que también influyen en el crecimiento, la conidiación o ambos. De esta forma la luz afecta principalmente a la conidiación, promoviendo la formación de conidios especialmente con longitudes de onda entre los 350 y los 380 nm y los 440 y los 450 nm. El oxígeno también es un factor relevante en el desarrollo de *T. atroviride*. Además de ser necesario para la supervivencia del hongo y la producción de nuevos tejidos, tras experimentar periodos de falta de oxígeno el hongo centra su actividad en la producción de conidios como respuesta a ese estímulo.

Los nutrientes juegan un papel esencial en la supervivencia de *T. atroviride*. Especialmente dependiente del carbono y del nitrógeno, su falta promueve la conidiación, sin embargo, la bibliografía no nos indica los valores óptimos de cada nutriente para cada especie (J.M. Steyaert et al. 2010). Otros factores como los daños en el micelio y los compuestos orgánicos volátiles también aceleran la conidiación.

3.2.3 Medio de cultivo

Las necesidades nutricionales de *T. atroviride* se basan en constantes y suficientes fuentes de carbono y nitrógeno para la producción de nuevos tejidos y el desarrollo del hongo. Diversos estudios sobre sus requerimientos nutricionales se han llevado a cabo para determinar qué medio es el óptimo para el cultivo de este hongo. Para ello, se comparó el crecimiento del hongo en diversos medios como Tryptic Soy Broth (TSB), Malt Extract Agar (MEA), Rose Bengal Agar (RBA) y Potato Dextrose Agar (PDA), que se describen en la Tabla 5.

Tabla 5: Composición de los posibles medios de cultivo de *T. atroviride*.(M. Sahid et al. 2014)

Medio	Composición
TSB (Tryptic Soy Broth)	-0,2 g MgSO ₄ -0,9 g K ₂ HPO ₄

ANEJO I: DESCRIPCIÓN DE LOS ORGANISMOS

	-0,15 g NaCl -1 g NH ₄ NO ₃ -3 g D+glucosa anhidra -950 ml Agua destilada
PDA/PDB (Potato Dextrose Agar/ Potato Dextrose Broth)	-20 g Dextrosa -15 g Agar -4 g Almidón de patata -1 l Agua destilada
MEA (Malt Extract Agar)	-20 g Extracto de malta -20 g Dextrosa -6 g Peptona -15 g Agar
RBA (Rose Bengal Agar)	-10 g Dextrosa -1 g KH ₂ PO ₄ -0,5 g MgSO ₄ -0,05 g Rosa de bengala -5 g Peptona S2 -15 g Agar

De esta forma (M. Sahid et al. 2014) se ha determinado que el mejor medio para el cultivo de *T. atroviride* es PDA (Potato Dextrose Agar) dado que da lugar a una mayor cantidad de biomasa.

3.2.4 Ciclo de vida

Como la práctica totalidad de los miembros del género *Trichoderma*, *T. atroviride* presenta un ciclo de vida asexual siendo su fase anamorfa la más común y haciendo su fase teleomorfa (*Hypocrea atroviridis*) prácticamente inexistente. De esta forma la reproducción es asexual y se lleva a cabo a través de los conidios, que son liberados al medio y dan lugar a nuevos tejidos y a un nuevo individuo genéticamente idéntico.

3.2.5 Acción en la rizosfera

El efecto producido por *T. atroviride* en la rizosfera es muy similar al de hongos del mismo género como *T. harzianum*, *T. virens* y *T. asperellum*, que llevan a cabo la detección y eliminación directa de otros hongos, la reducción del crecimiento de patógenos, la promoción del crecimiento del hospedante y la activación de la respuesta defensiva de la planta. Además de eliminar directamente el patógeno mediante la degradación de su pared celular y la colonización de su micelio tal y como se explica en el punto 3.1.5 del mismo anejo, produce antibióticos y metabolitos secundarios que inhiben el crecimiento del patógeno e incluso desencadenan la muerte celular de sus tejidos. Entre estos metabolitos secundarios con función antibiótica destacan los peptaibols, terpenos, policétidos, gliotoxinas y gliovirinas.

También es capaz de competir e inhibir el crecimiento de los potenciales patógenos a través de la ocupación del espacio y la monopolización de nutrientes esenciales como el hierro, explotado a través de sideróforos y gracias a la secreción de ácidos cítricos, glucónicos y fumáricos que aumentan su solubilidad y la de otros nutrientes, como magnesio y fosfatos.

ANEJO I: DESCRIPCIÓN DE LOS ORGANISMOS

Por último, también promueve el crecimiento de la planta hospedante y su resistencia a los factores abióticos, mediante la secreción de fitohormonas como citoquininas y giberelinas y mediante la provisión de nutrientes como hierro, magnesio, calcio, nitrógeno o fósforo a la planta. Todos estos efectos se recogen en la Tabla 6.

Tabla 6: Tabla resumen de la acción en la rizosfera de *T. atroviride*. (S.A. Nusaibah & H. Musa. 2019)

Metabolitos secundarios	-Peptaibols -Terpenos -Policétidos -Gliotoxinas -Gliovirinas -Tricolin
Mecanismos de competición	-Sideróforos -Ocupación del espacio -Solubilización de nutrientes
Promoción del crecimiento de la planta	-Secreción de fitohormonas -Provisión de nutrientes

4. PSEUDOMONAS SPP.

4.1 PSEUDOMONAS FLUORESCENS

P. fluorescens (Migula, 1895) es una bacteria gram negativa, considerada como Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) que se puede encontrar en suelos, agua y en la superficie de las plantas (G. Ganeshan & A.M. Kumar. 2007). Capaz de desplazarse gracias a múltiples flagelos, es una bacteria estrictamente aerobia, aunque ciertas cepas son capaces de utilizar NO₃ como fuente de electrones. También promueve el crecimiento vegetal a la vez que reduce los daños producidos por el ataque de hongos patógenos. Es por ello por lo que se han realizado numerosos estudios sobre esta bacteria y por lo que tiene una gran utilidad en los sectores forestal y agrario.

4.1.1 Taxonomía

En cuanto a la taxonomía, se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7: Taxonomía completa de *Pseudomonas fluorescens* M. (Fuente: NCBI)

Reino	<i>Bacteria</i>
Subreino	<i>Negibacteria</i>
Filo	<i>Proteobacteria</i>
Clase	<i>Gammaproteobacteria</i>
Orden	<i>Pseudomonadales</i>
Familia	<i>Pseudomonadaceae</i>
Género	<i>Pseudomonas</i>
Especie	<i>Pseudomonas fluorescens</i>

Al igual que *T.harzianum*, *P.fluorescens* es considerada una especie agregada compuesta, en este caso, por 52 especies (B.S.Scales, R.P.Dickson, J.J.LiPuma & G.B.Huffnagle. 2014).

4.1.2 Ecología

Presenta unas necesidades ecológicas similares a otras especies pertenecientes al mismo género siendo una especie frugal, de esta forma puede ser encontrada en gran diversidad de medios, principalmente en el suelo formando parte de la rizosfera, pero también en el agua, en otras partes del suelo o incluso en mamíferos y otros animales.

Presenta un amplio rango térmico, pudiendo soportar temperaturas entre los 4 °C y los 32 °C, pero presentando un crecimiento y desarrollo óptimos alrededor de los 27 °C. En cuanto al pH puede desarrollarse en medios moderadamente ácidos, hasta un pH 4, y ligeramente básicos hasta un pH 8, lo que indica que el valor de pH óptimo se encuentra entre el 6 y 7, ligeramente ácido-neutro.

Debido a sus escasas necesidades nutricionales, a su resistencia y a las estrategias llevadas a cabo por la bacteria, como la producción de sideróforos, *P. fluorescens* puede sobrevivir en medios con gran falta de nutrientes, encontrándose en gran variedad de medios, como el suelo, la rizosfera, la superficie de plantas y en medios acuosos. Esta es una de las claves de su gran capacidad de adaptación.

4.1.3 Medio de cultivo

Su naturaleza frugal hace *P. fluorescens* pueda ser cultivada en gran diversidad de medios sólidos y líquidos tal y como muestra la Tabla 8. De esta forma se pueden utilizar medios comunes como *nutrient broth/agar* y *tryptic soy broth/agar*. Sin embargo, para el cultivo selectivo de *P. fluorescens*, los medios pobres en hierro son de gran utilidad debido a que se fomenta la producción de pigmentos y sideróforos que permiten la identificación de esta bacteria (B.S. Scales, R.P. Dickson, J.J. LiPuma & G.B. Huffnagle. 2014). Así, medios como *Pseudomonas agar F medium*, agar CFC, agar Cetrimida y medio Kings son muy eficaces en la producción, crecimiento y selección de especies del género.

Por otro lado, el uso de medios mejorados como el medio LB enriquecido con glucosa suelen dar mejores resultados, que el mismo medio no enriquecido, en la producción de *P. fluorescens* (A. Passer & M. Khan).

Tabla 8: Composición de los posibles medios de cultivo de *P. fluorescens*.

NB/NA (Nutrient Broth/ Nutrient Agar)	-5 g Peptona -3 g Extracto de levadura -15 g Agar (Solo en NA) -5 g NaCl -1000 ml Agua destilada
TSB/TSA (Soy Broth/ Soy Agar)	-0,2 g MgSO ₄ -0,9 g K ₂ HPO ₄ -0,15 g NaCl -1 g NH ₄ NO ₃ -3 g D+glucosa anhidra -1000 ml Agua destilada (Solo en TSB) -15 g Agar (Solo en TSA)
PAF (<i>Pseudomonas Agar F</i>)	-10 g Peptona C -10 g Peptona Proteosa N°3 -10 g Glicerol -1,5 g K ₂ HPO ₄

ANEJO I: DESCRIPCIÓN DE LOS ORGANISMOS

	-1,5 g MgSO ₄ -15 g Agar -1000 ml Agua destilada
CFC (Cephalodine Fusidate Cetrimide)	-16 g Gelatina de Peptona -10 g Casitose -10 g K ₂ SO ₄ -1,4 g MgCl -15 g Agar -1000 ml Agua destilada
CA (Cetrimide Agar)	-20 g Peptona G -10 g K ₂ SO ₄ -1,4 g MgCl -3 g CTAB -10 ml Glicerina -13,6 g Agar -1000 ml Agua destilada
KM (Kings Medium)	-20 g Peptona Proteosa -10 g K ₂ SO ₄ -1,64 g MgCl -15 g Agar -1000 ml Agua destilada
LB (Luria-Bertani)	-10 g Triptona -10 g NaCl -5 g Extracto de levadura -1000 ml Agua destilada

4.1.4 Ciclo de vida

Debido a su comportamiento y función en el suelo *P. fluorescens* desarrolla el ciclo de vida propio de los llamados "Biofilms", tal y como se explica en el apartado 4.1.5. Por ello se pueden definir tres fases en la vida de esta bacteria.

- Adhesión: Al inicio de esta fase las bacterias se encuentran flotando individualmente, pero en un momento dado se comienzan a adherir a una superficie sólida y a generar sustancias poliméricas extracelulares (EPS), que van a mantener la futura colonia adherida a la superficie.
- Crecimiento: Una vez adheridas a una superficie, las bacterias comienzan a reproducirse y a crear colonias que adquieren estructuras tridimensionales. Estas pueden variar desde colonias de varias capas de células hasta varios centímetros de grosor.
- Separación: En esta última fase se produce la separación de bacterias individuales o de partes de la colonia, de forma que se reinicia el ciclo.

4.1.5 Acción en la rizosfera

La promoción del crecimiento de la planta y la inhibición de los patógenos son las principales funciones llevadas a cabo por *P. fluorescens* en la rizosfera. Como consecuencia de su presencia en el suelo, el crecimiento de la planta se ve incrementado y los daños producidos por enfermedades y patógenos son menores,

ANEJO I: DESCRIPCIÓN DE LOS ORGANISMOS

tanto en número como en gravedad. Esto se lleva a cabo mediante la facilitación de la absorción de nutrientes presentes en el medio, la secreción de metabolitos secundarios y el desarrollo de un biofilm.

Una vez que las bacterias se asocian con el sistema radical de la planta, influyen directamente en el crecimiento de la planta mediante la secreción de sustancias tales como fitohormonas, vitaminas solubles y reguladores del crecimiento entre otras, que estimulan el crecimiento vegetal y aumentan la disponibilidad de los nutrientes en el suelo. También influyen indirectamente mediante la producción de antibióticos, enzimas antifúngicas y enzimas degradadores de la pared celular en hongos, tal y como se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9: Principales metabolitos producidos por *P. fluorescens*

Compuestos	Acción
Cianuro de hidrógeno	Supresor del crecimiento de patógenos
Fenazinas	Antitumoral, antimicrobial y antiparasítico
Rizoxinas	Inhibición de la actividad en patógenos
Pirrolnitrina	Antibiótico antifúngico
Acidos pseudomónicos	Compuestos antibacterianos
ACC-desaminasa	Mejora de la nutrición vegetal

Todo ello hace que *P. fluorescens* sea considerada como un biofertilizante. Además de actuar como promotor del crecimiento, esta bacteria también es capaz de proteger al hospedante mediante la producción y liberación de antibióticos, metabolitos antifúngicos, la inducción de la respuesta defensiva y la creación del biofilm.

Con el desarrollo del biofilm, la bacteria ocupa la superficie radicular, impidiendo que los patógenos tengan acceso a ellas. Además, durante el desarrollo del biofilm el número de bacterias crece exponencialmente lo que hace que la producción y secreción de metabolitos secundarios se potencie.

Entre los metabolitos secundarios se encuentran sustancias que inhiben la actividad de hongos y bacterias, impiden su desarrollo y/o descomponen sus tejidos. Tal y como se muestra en la Tabla 9, la naturaleza de las secreciones es variada.

Sin embargo, la producción y liberación al medio de estas sustancias depende en gran medida de las condiciones del medio, de forma que el pH, la humedad, las características del suelo, la disponibilidad de oxígeno y la temperatura, influirán en la actividad de *P. fluorescens*.

4.2 PSEUDOMONAS PUTIDA

P. putida (Trevisan, 1889) es una bacteria PGPR, perteneciente al género *Pseudomonas* spp. Antiguamente considerada dentro de *P. fluorescens*, es considerada como una especie independiente debido a que presenta ciertas características especiales que la diferencian de *P. fluorescens*, como su incapacidad para hidrolizar las gelatinas, para producir pigmentos de fenazina o para crecer a altas temperaturas. Sin embargo, comparte muchas cualidades ecológicas, morfológicas y funcionales con las especies más cercanas, *P. fluorescens* y *P. aeruginosa*.

4.2.1 Taxonomía

Debido a la cercanía evolutiva de *P.putida* y *P.fluorescens*, sus taxonomías son similares, tal y como se muestra en las Tablas 6 y 10.

Tabla 10: Taxonomía completa de *P. putida* (T.) (Fuente: NCBI)

Reino	<i>Bacteria</i>
Subreino	<i>Negibacteria</i>
Filo	<i>Proteobacteria</i>
Clase	<i>Gammaproteobacteria</i>
Orden	<i>Pseudomonadales</i>
Familia	<i>Pseudomonadaceae</i>
Género	<i>Pseudomonas</i>
Especie	<i>Pseudomonas putida</i>

Al igual que en otras especies del mismo género, *P.putida* no es una especie completamente homogénea, sino que se pueden encontrar cepas de la misma especie con características ligeramente diferentes. Estas cepas se clasifican en dos grandes grupos, el subgrupo biotipo A y el subgrupo biotipo B, que se diferencian por su versatilidad nutricional.

4.2.2 Ecología

Debido a su cercanía evolutiva, los requerimientos ecológicos de *P. putida* y *P. fluorescens* son similares. Si bien es cierto que presentan ciertas diferencias. *P. putida* presenta un amplio rango de temperaturas, entre los 4°C y los 40 °C, en el que puede crecer y desarrollarse, sin embargo, su temperatura óptima de crecimiento se marca en 30°C, sufriendo alteraciones y modificaciones en la expresión de sus genes cuando la temperatura es extrema. A diferencia de otras especies del mismo género, requiere de un pH neutro (pH 7) para un crecimiento óptimo, aunque su rango de crecimiento se encuentra entre pH 6 y pH 8. Al igual que la mayor parte de bacterias del mismo género, *P.putida* es una bacteria aerobia que requiere un suministro constante y suficiente de oxígeno para su desarrollo y reproducción, viéndose afectada por la falta de este gas. En cuanto a sus necesidades nutricionales, es una especie frugal capaz de sobrevivir en medios con falta de nutrientes, a través de mecanismos como la producción de sideróforos. Sin embargo, el suministro de carbono y nitrógeno es esencial para su desarrollo aumentando este a medida que aumenta la concentración de nutrientes.

4.2.3 Medio de cultivo

Debido a su naturaleza frugal, expuesta anteriormente en el apartado 4.2.2 del mismo anejo, *P. putida* puede ser cultivada en gran variedad de medios tanto sólidos como líquidos, siempre y cuando constituyan una fuente suficiente de nitrógeno y carbono. De esta forma presenta unas necesidades nutricionales muy similares a las de *P. fluorescens*, por lo que se puede cultivar en los mismos medios, expuestos en la Tabla 8.

4.2.4 Ciclo de vida

El ciclo de vida de *P. putida* se basa en la colonización de nuevas áreas, el desarrollo de una colonia y la posterior separación y reinicio del ciclo. Este proceso, explicado anteriormente en el apartado 4.1.4 de este mismo anejo, es propio de las bacterias y se repite en el resto de organismos del mismo género que desarrollan su vida en la rizosfera.

4.2.5 Acción en la rizosfera

P. putida como bacteria PGPR lleva a cabo una importante labor en la rizosfera protegiendo a la planta y regulando su crecimiento y desarrollo. Destaca por su capacidad para incrementar la disponibilidad de nutrientes en el suelo. Mediante la producción de sideróforos, especialmente afines al Fe^{3+} , es capaz de captar hierro de la rizosfera, en aquellas situaciones de escasez de este nutriente y hacerlo disponible para la planta y la colonia.

También es capaz de regular el desarrollo, metabolismo y actividad de la planta hospedante mediante la secreción de fitohormonas, auxinas, citoquininas y giberelinas (E. Gamalero & B.R. Glcik. 2011), que regulan la división celular, la diferenciación celular, el inicio y fin de la quiescencia, el crecimiento de las raíces, la germinación de las semillas, etc.... Destaca la acción de la ACC deaminasa, que reduce los niveles de etileno favoreciendo el crecimiento radicular.

Además de influir en la planta mediante la promoción del crecimiento, desarrollo, actividad y de la regulación de la floración y fructificación, es capaz de proteger a la planta de organismos patógenos mediante la competición por recursos (nutrientes, espacio, etc...), la inducción de la respuesta inmune de la planta y, en menor medida, la producción de antibióticos.

ANEJO II. ESTUDIO Y ELECCIÓN DE LAS ALTERNATIVAS

Índice del Anejo II

1. INTRODUCCIÓN	1
2. DIRECTRICES DEL PROYECTO	1
2.1 CONDICIONES IMPUESTAS POR EL PROMOTOR	1
2.2 CRITERIOS DE VALOR	2
3. DEFINICIÓN DE LAS ALTERNATIVAS Y METODOLOGÍA	2
3.1 ALTERNATIVAS	2
3.2 METODOLOGÍA	3
4. EVALUACIÓN DE ALTERNATIVAS	3
4.1 IDENTIFICACIÓN GENÉTICA	3
4.1.1 Extracción y amplificación genéticas	3
4.1.1.1 Alternativas	3
4.1.1.2 Criterios de evaluación	4
4.1.1.3 Valoración de las alternativas	4
4.1.1.3.1 Alternativa 1. Protocolos	4
4.1.1.3.2 Alternativa 2. Kits	5
4.1.1.4 Elección de la alternativa final	5
4.1.2 Análisis del ADN	6
4.2 PROTOCOLOS A SEGUIR	6
4.2.1 Producción en masa de <i>Trichoderma spp.</i>	6
4.2.1.1 Alternativas	6
4.2.1.2 Criterios de evaluación	7
4.2.1.3 Valoración de las alternativas	7
4.2.1.3.1 Alternativa 1. Producción en sólido	7
4.2.1.3.2 Alternativa 2. Producción en líquido	7

ANEJO II: ESTUDIO DE LAS ALTERNATIVAS

4.2.1.4 Elección de la alternativa final	8
4.2.2 Formulación de <i>Trichoderma spp.</i>	8
4.2.2.1 Alternativas	8
4.2.2.2 Criterios de evaluación	9
4.2.2.3 Alternativa 1. Liofilizado	9
4.2.2.4 Alternativa 2. Centrifugado	10
4.2.2.5 Alternativa 3. No formulación	10
4.2.2.6 Elección de la alternativa final	10
4.2.3 Producción en masa de <i>Pseudomonas spp.</i>	11
4.2.4 Formulación de <i>Pseudomonas spp.</i>	11
4.3 ELECCIÓN DE LA MAQUINARIA	11
4.3.1 Alternativas de la producción en masa	11
4.3.1.1 Alternativas	11
4.3.1.2 Criterios de evaluación	12
4.3.1.3 Alternativa 1. SIP	12
4.3.1.4 Alternativa 2. Manual	12
4.3.1.5 Elección de la alternativa final	13
4.3.2. Alternativas de la liofilización	13
4.3.2.1 Alternativas	13
4.3.2.2 Criterios de evaluación	13
4.3.2.3 Alternativa1. Batch	14
4.3.2.4 Alternativa 2. Bulk	14
4.3.2.5 Elección de la alternativa final	14
5. RESUMEN DE LAS ALTERNATIVAS ELEGIDAS	14

1. INTRODUCCIÓN

Durante el proceso de desarrollo del presente proyecto van a surgir diversas opciones y respuestas a problemas que van a permitir alcanzar los objetivos definidos para el proyecto, pero siguiendo caminos diferentes, haciendo así que el proyecto evoluciones de forma distinta según el camino elegido. Estas opciones son las alternativas del proyecto.

El estudio de las alternativas permite al proyectista:

- Alcanzar los objetivos y finalidades del proyecto
- Identificar y evitar los problemas identificados durante el diseño
- Optimizar los recursos invertidos en el proyecto
- Minimizar los costes

Por consiguiente, la definición de las alternativas y el profundo estudio de estas es esencial para el diseño de un proyecto de calidad.

2. DIRECTRICES DEL PROYECTO

En el planteamiento del proyecto el promotor define una serie de condiciones y restricciones que van a limitar las alternativas a aplicar en el proyecto. De esta forma la localización del proyecto ya ha sido definida por el promotor, situándolo en las instalaciones y naves pertenecientes a la empresa IDForest-Biotecnología Forestal Aplicada S.L en la calle Curtidores número 17 del polígono de San Antolín (Palencia)

2.1 CONDICIONES IMPUESTAS POR EL PROMOTOR

En el planteamiento del proyecto se determinaron ciertas condiciones que van a afectar su resultado final. Estas marcarán el camino a seguir del proyecto e influirán en la elección de las alternativas surgidas durante su diseño.

Las condiciones impuestas por el promotor son las siguientes:

- El proyecto se llevará a cabo en sus instalaciones alquiladas por el promotor.
- Las especies a producir son las especies de hongos *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma atroviride* y las bacterias *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas putida* caracterizadas por su valor ecológico y ambiental.
- Se debe alcanzar la máxima eficiencia posible en el proceso productivo con el fin de alcanzar la máxima producción con la menor inversión de recursos y generación de desechos.
- Es necesario minimizar la inversión y los costes de producción, reduciendo el presupuesto lo máximo posible y aumentando el rendimiento del negocio.
- Se deben cumplir los puntos expuestos anteriormente, pero, a la par, se debe suministrar un producto de calidad que cumpla con el fin del proyecto y con los estándares de calidad impuestos por la empresa promotora.

-El impacto medioambiental producido por el proyecto debe ser mínimo de forma que el balance ecológico final sea positivo, resultando un proyecto beneficioso para el medioambiente.

2.2 CRITERIOS DE VALOR

Además de por la consecución de los objetivos del proyecto y por el seguimiento de las condiciones y limitaciones impuestas por el promotor, el proyecto será evaluado según unos criterios de valor:

-Se adaptará el proyecto a las especies objetivo: Los parámetros ecológicos que influyen en el crecimiento y desarrollo de los organismos elegidos tienen que adaptarse a la perfección a las condiciones requeridas por estos, con el fin de aumentar y optimizar la producción.

-El impacto económico del proyecto en el área en el que llevará a cabo: Al implantarse en un área susceptible de pérdida de población, debido al creciente problema de la despoblación rural se valorará el impacto del proyecto en la economía de la zona y su efecto en la fijación de población.

3. DEFINICIÓN DE LAS ALTERNATIVAS Y METODOLOGÍA

Las distintas alternativas que se nos presentan y la metodología seguida para su evaluación y la elección final de una de ellas son puntos clave en la evolución del proyecto. Por ello que se hace necesario definir y explicar previamente ambos puntos.

3.1 ALTERNATIVAS

En el proyecto que nos ocupa las alternativas van a aparecer principalmente durante la fase de estudio en laboratorio y en el proceso de diseño propiamente dicho. De esta forma la identificación genética, el diseño del protocolo a seguir, la planta de producción y las fases de liofilizado y envasado van a ser las que más alternativas presenten y, por tanto, en las que nos tenemos que centrar en este apartado.

-Identificación genética: En esta fase del proyecto se va a realizar un análisis genético con el propósito de determinar con exactitud las especies de hongos y bacterias con las que se está trabajando. En este proceso se distinguen tres subfases, que son la extracción del ADN, su amplificación y su análisis.

-Diseño del protocolo de producción a seguir: Debido a que se trabaja con organismos complejos que presentan variaciones dependiendo de su especie e incluso de la cepa utilizada, se requiere el diseño de un protocolo que defina las condiciones adecuadas para la producción de cada uno de ellos. Muchos factores van a influir en esta fase, tales como la temperatura, el pH, nutrición, etc... por lo que se abre una amplia variedad de alternativas que deben ser consideradas.

-Línea de producción: Con el fin de obtener el máximo rendimiento en el proceso de producción en masa la elección de la maquinaria a utilizar presenta una importancia vital, además de diversas alternativas que deben ser consideradas y analizadas. Ello permitirá elegir la maquinaria que mejor se adapte a las necesidades del proyecto.

3.2 METODOLOGÍA

Para el análisis de las alternativas surgidas en cada etapa del proyecto se va a seguir un análisis multicriterio por el cual se va a evaluar cada una de las alternativas conforme unos criterios predefinidos, asignando a cada alternativa una puntuación para cada criterio, que oscilará entre 0 y 1, según el criterio del proyectista. De esta forma la alternativa finalmente elegida será la de mayor puntuación, que será la que mejor cumpla los criterios.

Este tipo de análisis es ampliamente utilizado en muchos ámbitos profesionales y, debidamente adaptado a la situación que nos ocupa, cumplirá con su función ayudando a la toma de decisiones.

4. EVALUACIÓN DE LAS ALTERNATIVAS

4.1 IDENTIFICACIÓN GENÉTICA

La identificación genética se compone de tres subfases independientes:

- Extracción del ADN
- Amplificación del ADN
- Análisis del ADN

En cada una de ellas se presentan varias alternativas. Sin embargo, como las alternativas y criterios utilizados en la extracción y amplificación del ADN son los mismos, su análisis, evaluación y elección se van a realizar de forma conjunta con el objetivo de simplificar el proceso.

4.1.1 Extracción y amplificación del ADN

4.1.1.1 Alternativas

-Extracción del ADN: Las alternativas que se presentan son:

-Alternativa 1. Protocolos: La realización de la extracción del material genético siguiendo un protocolo ya definido, contrastado y estandarizado, utilizando reactivos y materiales del propio laboratorio del promotor.

-Alternativa 2. Kits: La realización de la extracción del material genético mediante el uso de kits de extracción que ya contienen los reactivos y materiales necesarios.

-Amplificación del ADN: La amplificación del material genético se va a realizar a través mediante una *Polimerase Chain Reaction* (PCR) convencional (no cuantitativa) utilizando el termociclador disponible en el laboratorio del promotor.

Las alternativas que se presentan son:

-Alternativa 1. Protocolos: La realización de la amplificación del ADN siguiendo protocolos estandarizados en los que se requiere la preparación *in situ* de las disoluciones necesarias con los materiales y reactivos pertenecientes al laboratorio.

-Alternativa 2. Kits: La realización de la amplificación del ADN mediante el uso de kits comerciales que ya incluyen todos los químicos, materiales y reactivos necesarios para la consecución de la amplificación.

4.1.1.2 Criterios de evaluación

Los criterios utilizados para la evaluación de las alternativas surgidas en esta fase del proyecto son los siguientes:

-Criterio 1. Coste: El coste económico de los procesos de extracción y amplificación.

-Criterio 2. Tiempo: El tiempo requerido para completar el análisis.

-Criterio 3. Experiencia: La experiencia previa del laboratorio en la utilización de las distintas técnicas.

-Criterio 4. Certificación: La obligatoriedad de uso de técnicas específicas para la consecución de otros trabajos ajenos al proyecto, como por ejemplo trabajos de certificación.

4.1.1.3 Valoración de las alternativas

4.1.1.3.1 Alternativa 1. Protocolos

- Criterio 1. Coste: Debido a la necesidad de utilizar los propios reactivos, maquinaria y materiales del laboratorio para la ruptura de tejidos, la captación y “filtrado” de las estructuras y moléculas que no son ADN y la conservación final del material genético, estos protocolos requieren una inversión importante de recursos, sin embargo, son económicamente más asequibles que otras opciones. Valoración: 0,6

Lo mismo ocurre en la amplificación. A pesar de utilizar los reactivos (nucleótidos, buffers, etc...) pertenecientes al promotor el coste final es menor que otras opciones. Valoración: 0,6

- Criterio 2. Tiempo: Aunque los profesionales del trabajo de laboratorio están habituados a ello, la elaboración de las mezclas y disoluciones requeridas y los procesos de centrifugado, atemperado, etc... incrementan el tiempo requerido para completar la extracción del ADN. Valoración: 0,4

Con respecto a la amplificación, todas las labores de elaboración de disoluciones y cálculo de reactivos alargan el proceso, ya de por sí extenso debido al programa seguido por la PCR. Valoración: 0,3

- Criterio 3. Experiencia: El laboratorio del promotor cuenta con profesionales con gran experiencia en el uso de estos protocolos. Aun así, el proyectista, que ha participado en este proceso, tiene una experiencia mucho menor, aunque previamente ya ha completado este tipo de protocolos. Valoración: 0,8

El caso de la amplificación del ADN es muy similar al del proceso de extracción, por lo que su valoración es la misma. Valoración: 0,8

- Criterio 4. Certificación: Además de en el presente proyecto la empresa promotora se encuentra involucrada en otros trabajos (certificaciones) que no exigen la utilización de estos protocolos. Valoración: 0,2

Lo mismo ocurre en la amplificación del ADN. Valoración: 0,2

4.1.1.3.2 Alternativa 2. Kits

- Criterio 1. Coste: Los kits de extracción son paquetes comerciales que contienen todos los materiales y reactivos necesarios para la extracción del material genético, previamente preparados. Esto hace que no sea necesaria la elaboración de las mezclas por parte de los técnicos y por tanto no es necesaria la compra de reactivos. Sin embargo, el precio de estos kits comerciales es significativamente mayor que el uso de protocolos estandarizados. Valoración: 0,2

Lo mismo ocurre en el caso de la amplificación del ADN, todos los reactivos y materiales ya vienen incluidos, facilitando la labor, pero a su vez incrementado el coste. Valoración: 0,2

- Criterio 2. Tiempo: Debido a que los reactivos ya vienen preparados en el interior del kit, únicamente se tiene que añadir el tejido del que se quiere obtener el material genético, lo que hace que el tiempo necesario para completar esta fase se acorte con respecto a otras opciones. Valoración: 0,6

Al ser la amplificación un proceso de mayor duración, esta reducción del tiempo adquiere una mayor importancia. Valoración: 0,7

- Criterio 3. Experiencia: El laboratorio del promotor cuenta con profesionales con gran experiencia en el uso de estos protocolos. Aun así, el proyectista, que ha participado en este proceso, tiene una experiencia mucho menor ya que nunca ha realizado una extracción mediante el uso de kits. Valoración: 0,6

Lo mismo ocurre en el caso de la amplificación. Valoración: 0,6

- Criterio 4. Certificación: Entre otros trabajos y proyectos la empresa promotora se dedica a la certificación de plantas truferas, verificando que están micorrizadas por *Tuber melanosporum*. La legislación vigente exige el uso de kits oficiales para llevar a cabo estos trabajos de certificación. Valoración: 1

La fase de amplificación también es susceptible a esta legislación, por lo que el uso de kits es necesario. Valoración: 1

4.1.1.4 Elección de la alternativa final

Tras el análisis de las diferentes alternativas y su evaluación con los criterios definidos, se procede a la elección de la alternativa finalmente elegida para la extracción del material genético.

Tabla 1: Elección final de la alternativa a seguir en la Extracción del ADN.

Alternativa	Coste	Tiempo	Experiencia	Certificación	TOTAL
Protocolos	0,6	0,4	0,8	0,2	2,0
Kits	0,2	0,6	0,6	1	2,4

La alternativa que mayores ventajas ofrece en el presente proyecto es la alternativa número 2, tal y como se muestra en la Tabla 1. Esto se debe a que a pesar de que es más costosa, reduce el tiempo necesario para la extracción, se tiene gran experiencia en el uso de estos kits y es necesario su uso para llevar a cabo otros trabajos y proyectos.

ANEJO II: ESTUDIO DE LAS ALTERNATIVAS

Tabla 2: Elección final de la alternativa a seguir en la Amplificación del ADN.

Alternativa	Coste	Tiempo	Experiencia	Certificación	TOTAL
Protocolos	0,6	0,3	0,8	0,2	1,9
Kits	0,2	0,7	0,6	1	2,5

Con respecto a las alternativas sobre la amplificación del ADN se ha elegido la segunda por las ventajas que ofrece sobre el ahorro de tiempo y por su necesidad para llevar a cabo trabajos de certificación.

4.1.2 Análisis del ADN

El análisis del ADN se compone de dos fases en nuestro proyecto. En una de ellas se va a comparar el ADN amplificado con muestras modelo, para determinar el grado de similitud de nuestras cepas con las cepas objetivo; en el caso de obtener un patrón similar al de las muestras modelo, considerado como positivo, se enviarán las muestras a secuenciar para determinar de forma precisa la especie y cepa con la que se trabaja, mientras que en el caso contrario, considerado negativo, el análisis del ADN habrá finalizado. Es por ello que en esta parte del proceso surgen alternativas en la primera fase del análisis del ADN. Sin embargo, en el presente proyecto no aparecen alternativas, sino que la única opción factible es la realización de electroforesis, debido a la especialización de la empresa promotora en esta técnica y a la falta de materiales para la realización de cualquier posible alternativa.

4.2 PROTOCOLO A SEGUIR

Los protocolos a seguir en la producción de *T. harzianum*, *T. atroviride*, *P. fluorescens* y *P. putida* adquieren una importancia vital en este proyecto debido a que la viabilidad del propio proyecto depende de estos.

Dentro del protocolo se pueden definir dos fases: la producción en masa y la formulación, en las que surgen alternativas dignas de ser estudiadas y evaluadas, tal y como se va a hacer a continuación.

4.2.1 Producción en masa de *Trichoderma spp.*

4.2.1.1 Alternativas

A pesar de que en este caso existen numerosos factores que influyen en la elección del protocolo de producción a seguir, lo que hace que su elección por el presente método sea imposible, se pueden distinguir dos grupos sobre los que sí se puede aplicar el análisis multicriterio, que nos ayudará a acotar las posibilidades. De esta forma se presentan dos alternativas:

-Alternativa 1. Producción en sólido: Elección y diseño de un protocolo de producción en masa en estado sólido, caracterizado por el uso de cereales (arroz, sorgo, maíz, trigo, etc...) hidratados y esterilizados a los que se inocula el hongo a producir, previamente cultivado en placa Petri (PDA), todo ello bajo condiciones controladas de temperatura, disponibilidad de nutrientes, acidez e incidencia de luz.

-Alternativa 2. Producción en líquido Elección y diseño de un protocolo de producción en masa en estado líquido, realizado en biorreactores diseñados y

construidos específicamente para la producción de microorganismos, bajo condiciones controladas (temperatura, agitación, aireación, acidez, nutrición, etc...).

4.2.1.2 Criterios de evaluación

Los criterios utilizados para la evaluación, análisis y posterior elección de la mejor alternativa son los siguientes:

- Criterio 1. Coste: Economía: El coste económico del proceso de producción.
- Criterio 2. Tiempo: El tiempo requerido para la consecución de la producción.
- Criterio 3. Calidad: La calidad del producto final alcanzado tras la producción.

4.2.1.3 Valoración de las alternativas

4.2.1.3.1 Alternativa 1. Producción en sólido

-Criterio 1. Coste: Debido a la utilización de sustratos simples, baratos y accesibles, sumado a la poca sofisticación de las herramientas y utensilios necesarios para llevar a cabo este tipo de protocolos, el coste económico de los protocolos de producción en masa de hongos es bajo. Valoración: 0,9

- Criterio 2. Tiempo: Debido a que la capacidad para controlar las condiciones de producción es limitada, al menor rendimiento de los sustratos utilizados, con respecto a los medios específicos, y al tiempo teórico requerido para la producción en masa de las especies objetivo, oscila entre los 12 y 15 días, el rendimiento de la producción no es óptimo. Valoración: 0,2

- Criterio 3. Calidad: Como ya se ha indicado anteriormente, el rendimiento de los sustratos utilizados en este tipo de producción no es el óptimo y el control sobre las condiciones del proceso productivo no es completamente preciso. Todo ello hace que la calidad final del producto no sea la deseada, afectando a la actividad de las esporas y a su densidad. Valoración: 0,3

4.2.1.3.2 Alternativa 2: Producción en líquido

- Criterio 1. Coste: En los procesos de producción en masa en estado líquido la maquinaria está específicamente diseñada la producción de microorganismos, siendo capaz de controlar de forma precisa y en tiempo real las condiciones de cultivo. Esto hace que su precio aumente enormemente, incrementando el coste económico del proceso de producción. Valoración: 0,2

- Criterio 2. Tiempo: Este exhaustivo control de las condiciones permite incrementar la eficiencia y rendimiento del proceso productivo, reduciendo el tiempo requerido para finalizar el proceso de producción a 9 días. Valoración :0,7

- Criterio 3. Calidad: Otro de los beneficios del uso de materiales específicos para el cultivo y producción de microorganismos es que la calidad final del producto es muy alta, obteniendo una gran concentración de esporas activas. Valoración: 0,8

4.2.1.4 Elección de la alternativa final

Finalmente, y tras el análisis de las alternativas que se presentan con respecto a los criterios de evaluación elegidos, se puede llevar a cabo la elección de la alternativa a aplicar en el proyecto.

Tabla 3: Elección final de la alternativa a seguir en el tipo de protocolo de producción.

Alternativa	Coste	Tiempo	Calidad	TOTAL
Producción en sólido	0,9	0,2	0,3	1,4
Producción en líquido	0,2	0,7	0,8	1,7

Como muestra la puntuación final de cada una de las alternativas, expuesta en la Tabla 3, la Alternativa 2 es la elegida debido a la calidad obtenida, medida en número de propágulos por unidad de volumen, y al menor tiempo necesario para llevar a cabo la producción, que a pesar de su alto coste hacen de la producción en masa en estado líquido una mejor opción.

Si bien es cierto que la alternativa a aplicar en el diseño de la línea de producción es la producción en estado líquido, la realización de producción en estado sólido a pequeña escala se muestra interesante debido al aporte de datos sobre el proceso de producción y las características y comportamiento de las cepas utilizadas. Por ello, como complemento, se ha decidido llevar a cabo la experimentación con la producción en estado sólido, que ayudará en la determinación de los protocolos preliminar y final.

Por otro lado, en este estudio de alternativas solo se ha decidido el tipo de protocolo a seguir, en este caso en estado líquido, pero el resto de factores que constituyen el protocolo de producción, tales como la temperatura, acidez, nutrientes, aireación, agitación y exposición a la luz, no han sido evaluados y, debido al gran abanico de alternativas que se presentan, el método de análisis multicriterio no puede aplicarse en este caso. Por ello se ha decidido elaborar un protocolo preliminar, desarrollado en el Anejo IV del presente proyecto a partir de la bibliografía consultada, que será testado y modificado para su optimización y para la definición del protocolo final de producción.

4.2.2. Formulación de *Trichoderma spp.*

4.2.2.1 Alternativas

La fase de formulación constituye la parte final del proceso productivo. En ella el hongo producido será procesado para asegurar su correcta conservación y concentración. Las alternativas que se presentan en la formulación final tanto de *T. harzianum*, como de *T. atroviride* son las siguientes:

- Alternativa 1. Liofilizado: En la fase final del protocolo de producción se procederá a la liofilización del producto con el fin de eliminar el medio líquido y la humedad de forma que se obtenga el hongo en forma de polvo manteniendo sus características y viabilidad; esto se consigue mediante la modificación de los parámetros de presión y temperatura. Su aplicación se realizará de forma directa en el suelo tras su hidratación.

- Alternativa 2. Centrifugado: En la fase final del protocolo de producción se realizará el centrifugado del producto con el fin de forzar la precipitación del tejido del hongo, lo que permitirá eliminar gran parte del medio líquido, conservando una pequeña parte, de forma que el producto podrá aplicarse en ese estado directamente en el suelo.
- Alternativa 3. No formulación: En la fase final del protocolo de producción no se aplicará ningún tratamiento del producto por lo que el hongo será suministrado dentro del propio medio líquido en el que se desarrolló, dentro de garrafas previamente esterilizadas.

4.2.2.2 Criterios de evaluación

La evaluación de cada una de las alternativas propuestas se va a realizar conforme a los siguientes criterios:

- Criterio 1. Coste: El coste total del proceso de formulación.
- Criterio 2. Viabilidad: El periodo de viabilidad del producto con cada formulación.
- Criterio 3. Pureza: La pureza y/o concentración final de esporas precursoras en cada tipo de formulación.
- Criterio 4. Manipulación: Modificaciones a realizar en el producto previamente a su aplicación en campo.

4.2.2.3 Alternativa 1: Liofilizado

- Criterio 1. Coste: El proceso de liofilizado requiere de maquinaria específicamente diseñada para este propósito. Estas máquinas, con diferentes opciones y capacidades, se diseñan a medida siguiendo los requerimientos del cliente, por lo que su coste es muy elevado. Valoración: 0,2
- Criterio 2. Viabilidad: Debido a que en el liofilizado se elimina la humedad presente en el medio y en el producto la viabilidad de este se alarga notablemente, algunos estudios (M. Grzegorzyc et al. 2018) indican que la viabilidad de los conidios producidos por *Trichoderma spp.* mantienen una alta viabilidad tras tres meses de conservación. Valoración: 0,9
- Criterio 3. Pureza: El producto obtenido tras el liofilizado se encuentra en forma de polvo, constituido casi únicamente por las hifas y los conidios desarrollados por el hongo, aunque pueden encontrarse ciertas trazas del medio de cultivo en el producto final; sin embargo, se puede considerar que su pureza, expresada en este caso en UFC/gr, es alta. Valoración: 0,9
- Criterio 4. Manipulación: Previamente a la aplicación del producto resultante de la liofilización, este se debe hidratar con agua de forma que se obtenga una mezcla líquida fácilmente aplicable en el suelo con las unidades formadoras de colonias (UFC/ml) recomendadas. Valoración: 0,5

4.2.2.4 Alternativa 2: Centrifugado

- Criterio 1. Coste: Para llevar a cabo el centrifugado se necesita una centrifugadora de grandes dimensiones adaptada a la función que se precisa, lo que constituye un coste importante. Valoración: 0,3

- Criterio 2. Viabilidad: Debido a que el producto final contiene parte del medio de cultivo, el periodo de viabilidad del hongo se acorta notablemente. Valoración: 0,5

- Criterio 3. Pureza: El producto final obtenido tras el proceso de formulación es el propio tejido del hongo suspendido en una pequeña cantidad del medio en que se ha desarrollado, por lo que su pureza, expresada en este caso en UFC/ml, puede definirse como media. Valoración: 0,5

- Criterio 4. Manipulación: La única medida previa a tomar antes de la aplicación del producto en el suelo es la adición de agua, hasta alcanzar las UFC/ml recomendadas, con el fin de favorecer la dispersión del hongo. Valoración: 0,6

4.2.2.5 Alternativa 3: No formulación

- Criterio 1. Coste: En lo relativo al coste del proceso esta alternativa presenta un coste bajo, ya que no se lleva a cabo formulación alguna tras el proceso de producción en masa, siendo la adquisición de las garrafas y su esterilización el único coste. Valoración: 0,9

- Criterio 2. Viabilidad: La viabilidad que presenta el producto con esta alternativa se reduce drásticamente hasta ser prácticamente nula tras el paso de pocas semanas, lo que afecta drásticamente a la viabilidad del proyecto. Valoración: 0,2

- Criterio 3. Pureza: La concentración/pureza del agente activo, expresada en UFC/ml. es la obtenida tras la producción en masa, lo que significa que es suficiente, de acuerdo a la legislación vigente, para su comercialización, pero menor comparada con el resto de alternativas. Valoración: 0,4

- Criterio 4. Manipulación: La única medida previa a tomar antes de la aplicación del producto en el suelo es la adición de agua, si se requiere, hasta alcanzar las UFC/ml recomendadas, con el fin de favorecer la dispersión del hongo. Valoración: 0,7

4.2.2.6 Elección de la alternativa final

Tras la descripción de cada una de las alternativas y su análisis con respecto a cada criterio, se va a proceder a su evaluación, de forma que la alternativa con una mayor puntuación será la que mejor satisfaga los requerimientos del proyecto, y por tanto, la elegida. La evaluación de las alternativas queda descrita en la Tabla 4.

Tabla 4: Elección final de la alternativa a seguir en la formulación de *Trichoderma spp.*

Alternativa	Coste	Viabilidad	Pureza	Manipulación	TOTAL
Liofilizado	0,2	0,8	0,9	0,5	2,4
Centrifugado	0,3	0,5	0,5	0,6	1,9
No formulación	0,9	0,2	0,4	0,7	2,2

Alumno: Rodrigo Herrera Sanz

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (CAMPUS DE PALENCIA). E.T.S. de Ingenierías Agrarias

Titulación: Grado en Ingeniería Forestal y del Medio Natural

Tal y como indica la Tabla 4 la alternativa número uno es la elegida para la formulación del producto final. Si bien es cierto que es la que constituye el mayor coste, también es la que mayor pureza y viabilidad del producto asegura.

4.2.3 Producción en masa de *Pseudomonas spp.*

El caso de la producción en masa de *Pseudomonas spp.* presenta características diferentes ya que no existe una alternativa viable para la producción en masa de esta bacteria en estado sólido, por lo que no es posible llevar a cabo un estudio de alternativas para la producción en masa de *Pseudomonas spp.* De esta forma esta fase de la producción se llevará a cabo dentro de un biorreactor en un medio líquido y en condiciones de temperatura, agitación, pH, oxigenación, suministro de nutrientes e incidencia de luz controladas.

4.2.4 Formulación de *Pseudomonas spp.*

Al igual que ocurre con el proceso de producción en masa no existen alternativas viables para la formulación y conservación a gran escala de *Pseudomonas spp.* más allá del liofilizado. Es por ello, y sumado a la elección de este método de formulación para *Trichoderma spp.*, por lo que el liofilizado se va a utilizar como método de preservación y formulación en *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas putida*.

4.3 ELECCIÓN DE LA MAQUINARIA

La maquinaria y tecnología a utilizar en el proceso de producción en masa va a estar directamente relacionada con el rendimiento del proceso y la calidad final del producto, es por lo que se debe prestar una atención especial a la elección de la maquinaria, los distintos modelos y sus capacidades para elegir la que mejor se adapte a las necesidades del proyecto.

En este estudio se van a analizar dos fases diferentes del proceso productivo:

- La producción en masa
- La formulación (liofilizado)

Para cada una de ellas se definirán las posibles alternativas a seguir, se procederá a la definición de los criterios de evaluación y a la elección de la mejor alternativa mediante el método de análisis multicriterio.

4.3.1 Alternativas de la producción en masa

La fase de producción en masa se va a llevar a cabo mediante el protocolo en estado líquido definido en el ANEJO IV; esto hace que para llevar a cabo este proceso se requiera una maquinaria capaz de controlar los parámetros de temperatura, acidez, agitación, oxigenación y disponibilidad de nutrientes en medios líquidos, lo que restringe las alternativas a los dispositivos conocidos como biorreactores o biofermentadores.

4.3.1.1 Alternativas

Actualmente y de forma general, los biorreactores ofrecen un servicio muy bueno, cumpliendo con su función a la perfección. Sin embargo, la esterilización tras su uso no es homogénea, pudiendo encontrar dispositivos que se esterilizan automáticamente y otros que necesitan ser esterilizados manualmente; de esta forma, ésta será la alternativa a discutir en esta parte de la línea de producción.

- Alternativa 1. SIP: Elección, instalación y uso de un dispositivo de biofermentación equipado con un sistema de esterilización en el lugar (SIP) a base de vapor de agua.
- Alternativa 2. Manual: Elección, instalación y uso de un sistema de biofermentación de esterilización manual.

4.3.1.2 Criterios de evaluación

La evaluación de ambas alternativas y la elección final de una de ellas, se llevará a cabo siguiendo los criterios siguientes:

- Criterio 1. Coste: Coste del sistema de biofermentación, entendiéndolo como el coste de adquisición, utilización y mantenimiento.
- Criterio 2. Rendimiento: Rendimiento del biorreactor.
- Criterio 3. Complejidad: Complejidad de los sistemas que componen el dispositivo.

4.3.1.3 Alternativa 1. SIP

- Criterio 1. Coste: De forma general, y debido a la incorporación de un sistema específico de esterilización automática a base de vapor de agua, los sistemas de biofermentación SIP presentan un coste de adquisición mayor que aquellos que no lo incluyen. Sin embargo, los costes de utilización y mantenimiento son prácticamente los mismo, dado que no se utilizan productos especiales en la esterilización que puedan aumentar el coste y el mantenimiento es muy similar. Valoración: 0,5

- Criterio 2. Rendimiento: El rendimiento de estos sistemas es mayor que el que presentan los biofermentadores de esterilización manual. Esto se debe a que el propio sistema lleva a cabo la esterilización de forma automática, invirtiendo menor tiempo y mano de obra y finalizando antes el proceso de esterilización. Valoración: 0,8

- Criterio 3. Complejidad: A pesar de incorporar sistemas adicionales, su complejidad es similar a la de los biorreactores de esterilización manual, debido a que estos también suelen incluir circuitos de vapor para el control de la temperatura del tanque. Además, los sistemas SIP están completamente automatizados, por lo que su utilización no requiere especialización en estos sistemas. Valoración: 0,6

4.3.1.4 Alternativa 2. Manual

- Criterio 1. Coste: El coste medio de adquisición de los sistemas de esterilización manual es sensiblemente menor que el de los sistemas SIP. Sin embargo, no hay diferencias remarcables en cuanto los costes de mantenimiento y utilización, siendo estos prácticamente iguales. Valoración: 0,7

- Criterio 2. Rendimiento: Debido a que el proceso de esterilización manual es sensiblemente más lento y laborioso que en los sistemas SIP, la productividad y el rendimiento del biofermentador se reducen considerablemente. Valoración: 0,4

- Criterio 3. Complejidad: Si bien es cierto que la complejidad general de sus sistemas es menor, los biorreactores de esterilización manual también incluyen sistemas de calentamiento y enfriamiento a base de agua fría y vapor de agua; sistemas parecidos a los SIP, pero de menor tamaño. En este caso, como se requiere manipular manualmente el interior del biorreactor, se requiere un conocimiento adecuado del equipo con el que se trabaja. Valoración: 0,7

4.3.1.5 Elección de la alternativa final

Tras la evaluación y valoración de cada alternativa con respecto a cada criterio, se va a proceder a comparar los resultados, mostrados en la Tabla 5, y a la elección de la alternativa a seguir.

Tabla 5: Elección de la alternativa a seguir con respecto biofermentador a utilizar en la producción en masa

Alternativa	Coste	Rendimiento	Complejidad	TOTAL
SIP	0,5	0,8	0,6	1,9
Manual	0,7	0,4	0,7	1,8

Finalmente, la alternativa a seguir es la de la adquisición y utilización de un sistema de biofermentación que incluya un sistema de esterilización en el lugar a base de vapor de agua. Este ofrece mayores ventajas en cuanto al rendimiento que compensan su mayor coste inicial.

4.3.2 Alternativas de la liofilización

4.3.2.1 Alternativas

En la elección de la maquinaria a utilizar en el proceso de liofilización surgen dos alternativas:

- Alternativa 1. *Batch*: Utilización de sistemas de liofilización en lotes, conocidos como "*Batch*". En estos sistemas el producto a liofilizar se introduce en pequeños frascos en los que se llevará a cabo todo el proceso de pérdida de humedad. De esta forma, una vez acabado el proceso, el producto se encuentra liofilizado y empaquetado, dado que estos frascos actúan como el paquete.
- Alternativa 2. *Bulk*: Utilización de sistemas de liofilización a granel, conocidos como "*Bulk*". En estos sistemas el producto en estado líquido se liofiliza directamente sobre las bandejas, de forma que al final del proceso, es necesario su empaquetado.

4.3.2.2 Criterios de evaluación

Los criterios utilizados para la evaluación de las alternativas son los siguientes:

- Criterio 1. Coste: El coste de adquisición, mantenimiento y utilización del sistema.
- Criterio 2. Calidad: La calidad final del producto.

4.3.2.3 Alternativa 1. *Batch*

- Criterio 1. Coste: El coste de adquisición y mantenimiento de los sistemas *Batch* es el mismo que el del resto de sistemas de liofilización, dado que no incluyen sistemas especiales. Sin embargo, los costes de utilización son mucho mayores, ya que los frascos utilizados presentan un volumen muy pequeño y un coste muy alto, lo que aumenta el coste del proceso. Valoración: 0.3

- Criterio 2. Calidad: La calidad de los productos obtenidos de esta forma es insuperable. Debido a que el producto se liofiliza en el interior del embalaje en el que se va a comercializar, esta conserva parámetros de humedad óptimos, que son los alcanzados en el interior de la cámara de liofilización. Valoración: 1.0

4.3.2.4 Alternativa 2. *Bulk*

- Criterio 1. Coste: El coste de adquisición y mantenimiento de los sistemas *Bulk* es el mismo que el del resto de sistemas de liofilización. Por el contrario, el coste de producción es inferior al de los sistemas *Batch*, debido a que se prescinde de los frascos que componen los lotes. En ciertas ocasiones se pueden utilizar bandejas especiales con recubrimiento de membrana, que evitan la pérdida de producto por salpicado y que aumentan el coste, pero nunca llegando a los costes de utilización de los sistemas por lotes. Valoración: 0.7

- Criterio 2. Calidad: La calidad del producto final puede verse afectada en el caso de no llevar a cabo el proceso correctamente. Al tener que empaquetar el producto, las condiciones de humedad se modifican, dejando de ser óptimos, además ciertas cantidades de producto pueden perderse durante la sublimación de la humedad al salpicar. Sin embargo, estos inconvenientes se pueden minimizar mediante el uso de bandejas con membrana, de forma que se mantiene la calidad. Valoración: 0.7

4.3.2.5 Elección de la alternativa final

Una vez valoradas las alternativas, se procede a su comparación y a la elección de la alternativa a seguir. La Tabla 6, muestra los resultados finales:

Tabla 6: Elección de la alternativa a seguir con respecto al sistema de liofilización a utilizar.

Alternativas	Coste	Calidad	TOTAL
<i>Batch</i>	0,3	0,9	1,3
<i>Bulk</i>	0,7	0,7	1,4

La alternativa a aplicar es la número 2, por lo que el sistema a utilizar será un sistema de liofilización a granel. Esto se debe a su menor coste y a la capacidad de mantener la calidad del producto cuando se utilizan bandejas especiales.

5. RESUMEN DE LAS ALTERNATIVAS ELEGIDAS

Tras el estudio, valoración y elección de las alternativas a llevar a cabo en los puntos anteriores, a continuación, en la Tabla 7, se realiza un resumen de las alternativas elegidas.

Tabla 7: Resumen de las alternativas elegidas.

Campo	Alternativa elegida	Descripción
Extracción del ADN	Kits	Realización de la extracción del material genético mediante el uso de kits de extracción que ya contienen los reactivos y materiales necesarios
Amplificación del ADN	Kits	Realización de la amplificación del ADN mediante el uso de kits comerciales que ya incluyen todos los químicos, materiales y reactivos necesarios para la amplificación.
Producción en masa (protocolo)	Producción en líquido	Elección y diseño de un protocolo de producción en masa en estado líquido, realizado en biorreactores diseñados y contruidos específicamente para la producción de microorganismos, bajo condiciones controladas
Formulación (protocolo)	Liofilización	En la fase final del protocolo de producción se procederá a la liofilización del producto con el fin de eliminar el medio líquido y la humedad de forma que se obtenga el hongo en forma de polvo manteniendo sus características y viabilidad
Producción en masa (equipos)	SIP	Elección, instalación y uso de un dispositivo de biofermentación equipado con un sistema de esterilización en el lugar (SIP) a base de vapor de agua
Formulación (equipos)	<i>Bulk</i>	Utilización de sistemas de liofilización a granel, conocidos como " <i>Bulk</i> ". En estos sistemas el producto en estado líquido se liofiliza directamente sobre las bandejas, de forma que al final del proceso, es necesario su empaquetado

ANEJO III: IDENTIFICACION GENÉTICA

Índice del Anejo III

1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	1
3. METODOLOGÍA	1
3.1 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS	2
3.2 EXTRACCIÓN DEL ADN	3
3.2.1 Extracción del ADN de las muestras 1 y 2	3
3.2.1.1 Material utilizado	4
3.3 AMPLIFICACIÓN DEL ADN	5
3.3.1 Amplificación del ADN de las muestras 1 y 2	6
3.3.1.1 Material utilizado	7
3.3.2 Amplificación del ADN de las muestras 3 y 4	8
3.3.2.1 Material utilizado	10
3.4 ANÁLISIS DEL ADN	10
3.4.1 Análisis del ADN de las muestras 1 y 2	11
3.4.1.1 Material utilizado	11
3.4.2 Análisis del ADN de las muestras 3 y 4	12
3.4.2.1 Material utilizado	13
3.5 IDENTIFICACIÓN FINAL	13
3.5.1 Identificación final de las muestras 1 y 2	13
3.5.2 Identificación final de las muestras 3 y 4	14

1. INTRODUCCIÓN

En todo proceso productivo es esencial determinar qué se quiere producir, sus características, cómo se puede producir, alternativas y la demanda (mercado) existente.

En esta parte del proyecto tratamos el primero de los puntos a cubrir, por lo que el que se va a producir es el tema principal de este anejo.

En este proyecto la identificación de los organismos a producir adquiere una importancia vital debido a que las especies objetivo presentan las características deseadas, ausentes en especies estrechamente relacionadas con ellas. En caso de no realizar la identificación pertinente o no ser esta lo suficientemente precisa, existiría un nivel de incertidumbre que no nos permitiría asegurar que el resultado del proceso productivo es el anunciado.

Por ello y para evitar posibles errores, se llevará a cabo la determinación más rigurosa y precisa posible a través de la identificación genética de las cepas en nuestra posesión; de esta forma verificaremos que las cepas utilizadas son las deseadas.

2. OBJETIVOS

Puesto que el propósito del proyecto es el diseño de la línea de producción de microorganismos protectores, específicamente *T. harzianum*, *T. atroviride*, *P. fluorescens* y *P. putida*, necesitamos verificar que las cepas en nuestra posesión son las correctas. Por ello el objetivo único de esta fase del proyecto es la determinación exacta de las cepas a utilizar a través de su identificación genética, adaptada a las características de cada especie.

3. METODOLOGÍA

La identificación genética es el proceso por el cual se es capaz de determinar de forma rigurosa y precisa el organismo con el que se está trabajando, a través de la obtención y análisis de su ADN. Para ello se utilizan técnicas y tecnologías desarrolladas para este propósito.

Para la identificación genética de las cepas en nuestra posesión, se completarán tres fases:

- Extracción del ADN
- Amplificación del ADN
- Análisis posterior

En cada una de las fases, excepto en el análisis posterior, se pueden utilizar distintos protocolos y técnicas que difieren en los químicos utilizados, sus cantidades, el tiempo requerido para completarlos y, en ciertos casos, su naturaleza. De esta forma se dispone de diversas alternativas ya definidas, analizadas y desarrolladas en el Anejo III.

En este caso la alternativa elegida para llevar a cabo la extracción y amplificación del ADN, es el uso de kits específicos para cada parte del proceso.

Esta elección se basa en las siguientes razones:

- Menores requerimientos técnicos: Debido a que los kits ya incorporan gran parte de los reactivos y compuestos necesarios, no es preciso ni tener reservas de estos en el laboratorio ni conservarlos en los frigoríficos y congeladores.

- Menor tiempo invertido: Como una buena parte del proceso ya viene completada en el kit, el tiempo requerido para completar la extracción y/o amplificación del ADN se reduce.
- Certificación: En el sector de la certificación se suele exigir el uso normalizado de ciertos kits y, dado que la empresa promotora también se dedica a la certificación, en todos estos procesos se usan kits.

Con respecto al análisis posterior se ha decido realizar una electroforesis que permitirá la comparación de las cepas utilizadas con modelos cuya especie ya es conocida. La elección de esta técnica se debe a la amplia experiencia y control de esta técnica además de su bajo coste.

Sin embargo, la electroforesis solo nos permite comparar la longitud de las regiones del ADN amplificadas entre la cepa a analizar y el modelo; no nos aporta información sobre la composición de estas regiones. Por ello los productos de la amplificación se enviarán a la empresa STAB VIDA, situada en Portugal, la cual, se encargará de su secuenciación y el envío de los resultados finales.

3.1 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

Las muestras con las que se trabaja y a las que se ha sometido la identificación genética, completando el proceso y adaptándolo a las características propias de cada especie, fueron obtenidas tras el análisis de muestra radicales, pertenecientes a la especie *Olea europaea* (L.) y *Quercus ilex* subsp. *ballota* (L.) que fueron enviada al laboratorio de la empresa promotora. Los microorganismos presentes en las raíces se aislaron y cultivaron dando lugar al primer propágulo utilizado en el proyecto.

Por su parte las muestras de hongos, a partir de ahora denominadas “muestra 1” y “muestra 2”, aisladas a partir de la muestra de encina, se han cultivado y reproducido sucesivamente en medio PDA, mediante la adición de medio de cultivo colonizado en una nueva placa, en ausencia de luz directa y a una temperatura de 25-27 °C, realizando un nuevo cultivo cada 4-5 días para evitar la muerte del hongo. Así mismo las bacterias obtenidas de la raíz de olivo, a partir de ahora denominadas “muestra 3” y “muestra 4” se han cultivado en medio NA, mediante raspado del medio de cultivo, en ausencia de luz y a una temperatura de 25-27 °C, preparando un nuevo cultivo cada 9-10 días.

Tanto el cultivo como la reproducción de los microorganismos se ha realizado en condiciones de esterilidad, en una campana de flujo laminar y con materiales completamente esterilizados mediante el uso de alcohol y mecheros *Bunsen*; todo ello con el fin de asegurar el correcto cultivo y reproducción de los microorganismos con los que se trabaja y para minimizar las probabilidades de contaminación.

Debido a que se trabaja con dos especies de hongos y dos especies de bacterias del mismo género respectivamente que presentan características similares entre sí, se va a definir un protocolo común para los hongos y otro para las bacterias, ya que no existen diferencias relevantes que hagan necesario crear un protocolo específico para cada especie.

3.2 EXTRACCIÓN DEL ADN

Esta primera fase se centra en la obtención del material genético del organismo con el que se trabaja. Para ello es necesario romper las estructuras celulares que contienen el ADN y eliminarlas junto con todas las moléculas contenidas en la célula que no sean parte del material genético. Al mismo tiempo, es necesario proteger el ADN de los procesos biológicos que causan su destrucción y degradación, desencadenados tras la muerte celular.

Debido a que las cepas objeto del análisis pertenecen a distintos grupos taxonómicos y a que presentan características y estructuras distintas, la extracción del ADN se llevará a cabo de diferente manera. De hecho, solo se realizará la extracción del material genético en el caso de los hongos ya que presentan gran cantidad de orgánulos y estructuras que hacen necesaria esta extracción. Por el contrario, la muestra 3 y la muestra 4 son bacterias, organismos procariotas unicelulares, en los que la cantidad de membranas que contienen el material genético es menor, esto unido a la falta de orgánulos en su interior, hace que no sea necesario llevar a cabo la fase específica de extracción del ADN, sino que es posible amplificarlo directamente tras la ruptura de las células.

3.2.1 Extracción del ADN de las muestras 1 y 2

Tras el cultivo y análisis visual de las muestras 1 y 2 se ha determinado que son hongos pertenecientes a la división ascomycota, que generan extensas y complejas estructuras, recubiertas por membranas, en forma de micelio donde su ADN y orgánulos se encuentran contenidos y protegidos. Por consiguiente, para su identificación genética, es necesario realizar la extracción de su ADN, separándolo del resto de moléculas, orgánulos y estructuras que lo componen.

El proceso de extracción se va a llevar a cabo mediante el uso de un kit específico para esta tarea, tal y como se indica en el Anejo II. El modelo de kit utilizado es el E.Z.N.A.® Plant DNA Kit de 200 preparaciones, producido por la empresa Omega Bio-tek y que contiene los reactivos y algunos de los materiales necesarios para llevar a cabo la extracción. Estos son:

- HiBind® DNA Mini Columns
- 2 ml Tubos de recolección
- Mezcla tampón BL
- Mezcla tampón TL
- Mezcla tampón HBC
- Mezcla tampón de lavado de ADN
- Mezcla tampón de elución

El protocolo a seguir con este kit está compuesto por 8 pasos:

-1. Añadir 300 µl de la mezcla TL en tubos eppendorf. A continuación, se añade la muestra y se disgrega con un micropistilo. Una vez disgregada se añaden otros 300 µl de la mezcla TL.

-2. Tras mezclar bien la disolución se añaden 140 µl de la mezcla BL y se vuelve a mezclar para, posteriormente centrifugarlo durante 10 minutos.

-3. Pasados los 10 minutos de centrifugado se toma el líquido de la parte superior (alrededor de 600 µl) sin tocar el *pellet* formado en la parte inferior del tubo y se añaden 300 µl del tampón HBC y 600 µl de etanol, mezclándolo bien.

-4. Se extraen 750 µl de la mezcla y se introducen en la columna HiBind, en el interior de un tubo de recolección. Posteriormente la mezcla se centrifugará durante 1 minuto y el líquido acumulado en el tubo recolector será desechado.

-5. Se repetirá el paso anterior a cuya finalización se desechará el tubo recolector.

-6. La columna HiBind se introduce en un nuevo tubo recolector, se añaden 650 µl del líquido de lavado de ADN y se centrifuga durante 1 minuto, tirando el líquido acumulado en el tubo recolector. Este paso se repetirá, pero esta vez centrifugando durante 2 minutos.

-7. La columna HiBind se introduce en un nuevo tubo eppendorf y se añaden 100 µl de tampón de elución previamente calentado a 65 °C, dejándolo incubar durante 5 minutos.

-8. Posteriormente se centrifuga la mezcla durante 1 minuto, de forma que el líquido acumulado en el tubo eppendorf es el ADN de la muestra. Finalmente, el ADN obtenido se conservará a -20 °C hasta la realización de la amplificación.

En este protocolo se pueden distinguir tres fases bien diferenciadas:

- Fase 1: Comprende los tres primeros puntos del protocolo. En ella se busca eliminar las grandes estructuras de la célula, estructuras como membranas y paredes celulares. Esto se consigue mediante la ruptura del tejido y el centrifugado que fuerza estas pesadas estructuras a precipitar formando un *pellet*. Además, se busca proteger el ADN de cualquier degradación por parte de las enzimas líticas del ADN mediante la adición del tampón TL y BL.

- Fase 2: Comprende los puntos 3º, 4º, 5º y 6º del protocolo. En esta fase se pretenden eliminar las macromoléculas que se encuentran junto al ADN, tales como grasas, proteínas y glúcidos. Para ello se utilizan el tampón HBC, el etanol y la columna HiBind, la cual presenta una gran afinidad por el ADN y actúa como filtro durante el centrifugado, permitiendo el paso del resto de macromoléculas e impidiéndoselo al ADN.

-Fase 3: La última de las fases de la extracción. Comprende los puntos 7º y 8º. Tras la eliminación de las proteínas, grasas y glúcidos, únicamente glúcidos simples, gases y el ARN permanecen junto al ADN, por ello se necesita separar estas moléculas de la molécula objetivo, el ADN. Para ello, se añade el tampón de elución, el cual presenta una mayor afinidad por el ADN que la columna HiBind por lo que, tras el centrifugado, el líquido obtenido al fondo del tubo eppendorf contiene el ADN junto con el tampón.

3.2.1.1 Material utilizado

En este proceso de extracción y la posterior conservación del ADN se utilizan diversos materiales, reactivos y utensilios de laboratorio que permiten la correcta y exitosa ejecución de esta fase de la identificación genética. Algunos de los reactivos y materiales necesarios vienen incluidos en el kit utilizado, mientras que el resto pertenecen al laboratorio del promotor.

Todos los materiales utilizados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1: Materiales utilizados en la extracción del ADN para cada una de las muestras 1 y 2.

Material	Cantidad	Especificaciones
E.Z.N.A. ® Plant DNA Kit	1 unidad	- 2 tubos de recolección - 1 columna HiBind - Tampón TL 600 µl - Tampón BL 140 µl - Tampón HBC 600 µl - Tampón de lavado de ADN 650 µl - Tampón de elución 100 µl
Tubos eppendorf	2 unidades	
Micropistilo	1 unidad	
Vortex	1 unidad	-Para la mezcla de disoluciones
Centrífuga	1 unidad	- Para la precipitación y separación de estructuras y moléculas
Etanol	600 µl	
Gradilla	1 unidad	
Micropipeta	1 unidad	
Puntas de pipeta	7-9 unidades	
Termostatizado	1 unidad	- Para el mantenimiento de la temperatura

3.3 AMPLIFICACIÓN DEL ADN

La amplificación del ADN es el segundo paso a seguir en el proceso de identificación. Lo que se pretende con ello es replicar las partes del ADN que sirven para la identificación del organismo. Por ello la elección de la zona a amplificar es crucial para llevar a cabo la correcta identificación de la especie.

En este caso se utilizará la técnica conocida como PCR (Polymerase Chain Reaction) que se basa en la replicación artificial del ADN dirigiéndola a zonas concretas de la doble cadena, tal y como se muestra en la Figura 1. Por lo tanto, para llevarla a cabo se necesitan los elementos y moléculas que intervienen en la replicación del ADN.

Para completar esta replicación se utilizará un kit específico para ello que contiene los elementos generales necesarios para llevar a cabo la PCR. El modelo de kit utilizado es el ilustra PuReTaq Ready-To-Go PCR Beads, producido y suministrado por la empresa GE Healthcare.

Los reactivos del kit se mantienen a temperatura ambiente y comprenden:

- 2,5 unidades de enzima PuReTaq ADN polimerasa.
- Desoxirribonucleótidos
- Estabilizadores.
- BSA (Bovine Serum Albumin)
- Mezcla Tampón.

Además de los reactivos suministrados por el kit se necesitará el ADN, los *primers* utilizados en cada caso y el agua destilada.

3.3.1 Amplificación del ADN de las muestras 1 y 2.

Debido a que trabajamos con hongos se amplificará la región correspondiente a la codificación de los ribosomas, determinada por los *primers* ITS1F y su complementario ITS4. Esta parte del ADN ha sido la elegida debido a su gran polimorfismo y a su amplia utilización en la identificación genética.

Siempre que se llevan a cabo este tipo de técnicas es necesaria la incorporación de controles que indiquen si el resultado obtenido es fiable. Por ello se añadirán dos muestras de control, uno positivo y otro negativo. Para el control positivo se utilizará un patrón de cada especie de interés y para el negativo agua destilada, ambos conservados en los congeladores del laboratorio.

De esta forma la mezcla final formada incluirá, además de los componentes del kit, las sustancias recogidas en la Tabla 2, teniendo en cuenta que el volumen a alcanzar es de 25 μ l.

Tabla 2: Composición final de las mezclas creadas para la PCR de las muestras 1 y 2.

Mezcla	ADN (μ l)	ITS1F (μ l)	ITS4 (μ l)	Agua (μ l)	Total (μ l)
Muestra ADN 1	1	1	1	22	25
Muestra ADN 2	1	1	1	22	25
Control Positivo 1 (<i>T.harzianum</i>)	1	1	1	22	25
Control Positivo 2 (<i>T. atroviride</i>)	1	1	1	22	25
Control Negativo (Agua Destilada)	-	1	1	23	25

Una vez que tanto las muestras como los controles están preparados se introducen en la máquina de PCR y se establece el programa a seguir, adaptándolo a las características de los *primers* y de la enzima ADN polimerasa. El programa establece el número de ciclos a completar, la temperatura y el tiempo de cada fase.

Para este caso se utilizó un programa, detallado en la Tabla 3, ya utilizado en el laboratorio para la enzima y los *primers* utilizados.

Tabla 3: Descripción del programa a seguir en la amplificación del ADN de las muestras 1 y 2.

Número de Ciclos	Fase	Temperatura ($^{\circ}$ C)	Tiempo (min)
1	1	95	9
35	2	95	1
	3	54	1
	4	72	1
1	5	72	10
-	6	10	indefinido

Este programa está compuesto por seis fases diferenciadas cada una de las cuales cumple con un propósito:

- Fase 1: Fase de preparación. En ella se aplican altas temperaturas con el fin de desnaturalizar la doble hélice de ADN mediante la ruptura de los puentes de hidrógeno que unen las bases nitrogenadas complementarias, de forma que la enzima ADN polimerasa podrá realizar su función.
- Fase 2: Es la primera fase de la replicación. En ella también se aplican altas temperaturas con el mismo objetivo que en la Fase 1, desnaturalizar el ADN.
- Fase 3: En este punto del ciclo la temperatura se reduce con el fin de permitir la unión de los *primers* a la hebra de ADN molde. Se comienzan a unir nucleótidos complementarios a cada una de las ramas de la cadena de ADN dividida en las fases anteriores.
- Fase 4: En esta última fase del ciclo se produce la unión de la enzima ADN polimerasa a la hebra de ADN a copiar, dando lugar a la polimerización, la unión de nucleótidos complementarios a la hebra de ADN.
- Fase 5: No considerada parte del ciclo. Tiene como función dar tiempo a la enzima ADN polimerasa para finalizar la replicación del ADN
- Fase 6: Fase de conservación

3.3.1.1 Material utilizado

Para realizar esta fase del proceso se han tenido que utilizar diversos materiales e instrumentos específicos, diseñados para la tarea que se trata y el trabajo en laboratorio, que han permitido completar con éxito la amplificación del ADN.

Todo este material pertenece a la empresa promotora, la cual ha permitido su uso para la realización del análisis.

La información completa de las herramientas y materiales utilizados se encuentra sintetizada en la Tabla 4.

Tabla 4: Resumen del material utilizado.

Material	Cantidad	Especificaciones
Kit PuReTaq Ready-To-Go PCR Beads	2 unidades	-Bisturí -Reactivos generales PCR -Tubos PCR
Micropipeta	1 unidad	-Volumen 0,2-20 µl
Puntas Pipeta	5-6 unidades	-Puntas desechables
Vortex	1 unidad	-Utilizado en el atemperado de reactivos -Utilizado en el proceso de mezcla
Centrífuga	1 unidad	-Utilizada en el proceso de mezcla
Tubos Eppendorf	10-12 unidades	

ANEJO III: IDENTIFICACIÓN GENÉTICA

Hielo	2 petacas	-Para conservar el ADN y los primers
Termociclador	1 unidad	
Ordenador	1 unidad	-Con el software 7500 v y conectado a la máquina de PCR

3.3.2 Amplificación del ADN de las muestras 3 y 4.

Antes de realizar la amplificación del ADN de las bacterias es necesario romper los tejidos que lo contienen. Para ello se tomarán muestras de cada especie a las que se aplicarán altas temperaturas, tal y como se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5: Tratamiento para la ruptura de las bacterias de las muestras 3 y 4.

Muestras	Cantidad (μ l)	Temperatura ($^{\circ}$ C)	Tiempo (min)
Muestra ADN 3	30	90	10
Muestra ADN 4	30	90	10

Una vez destruidas las membranas que contenían el ADN, se va a proceder a su amplificación. Tal y como se ha explicado se llevará a cabo a través de la Polimerase Chain Reaction (PCR) que replicará y amplificará la parte del material genético de interés

Se va a utilizar el kit específico para la amplificación del material genético citado anteriormente junto con las muestras, agua desionizada y los *primers* 16S *Forward* (16SF) y 16S *Reverse* (16SR). Estos *primers* dirigen la PCR a la parte del ADN que codifica el ARN ribosómico en bacterias. Por ello, se trata de una región con gran polimorfismo que permitirá la identificación genética de las muestras.

Como control positivo se utilizará un patrón de la especie de interés y como control negativo agua destilada, para verificar que la amplificación se realiza correctamente.

Todos los compuestos necesarios se introducen en tubos Eppendorf y se mezclan en el vortex y en la centrifugadora con el fin de que los reactivos entren en contacto entre sí y obteniendo las mezclas indicadas en la Tabla 6.

Tabla 6: Composición de las mezclas creadas para la PCR de las muestras 3 y 4.

Mezcla	ADN (μ l)	16SF (μ l)	16SR (μ l)	Agua (μ l)	Total (μ l)
Muestra ADN 3	1	1	1	22	25
Muestra ADN 4	1	1	1	22	25
Control Positivo 3 (<i>P. fluorescens</i>)	1	1	1	22	25
Control Positivo 4 (<i>P. putida</i>)	1	1	1	22	25
Control Negativo (Agua Destilada)	-	1	1	23	25

ANEJO III: IDENTIFICACIÓN GENÉTICA

Control Negativo (Agua Destilada)	-	1	1	23	25
-----------------------------------	---	---	---	----	----

Una vez todos los componentes se encuentran mezclados de forma homogénea se procederá a introducirlos en el termociclador, la cual establecerá las condiciones necesarias para la replicación de la parte del ADN, delimitada por los *primers*, de interés.

El programa a seguir se adapta a las características del material genético bacteriano, más corto y simple que el de otros organismos y siempre completando el menor número de ciclos posible, con el fin de evitar los errores producidos por la enzima ADN polimerasa en la replicación.

El programa elegido, detallado en la Tabla 7, está dividido en 6 fases y tiene 35 ciclos.

Tabla 7: Descripción del programa a seguir en la amplificación del ADN de las muestras 3 y 4.

Número de ciclos	Fase	Temperatura (°C)	Tiempo (s)
1	1	94	420
35	2	94	5
	3	55	10
	4	72	60
1	5	72	420
-	6	10	indefinido

El propósito de cada una de las fases es el siguiente:

-Fase 1: Fase de preparación. En este primer estadio de la amplificación lo que se busca es el completo desdoblamiento inicial de la doble cadena de ADN. Para ello se aplican altas temperaturas (94 °C) que romperán los enlaces entre las bases nitrogenadas, pero que no llegarán a desnaturalizar la enzima ADN polimerasa. Solo se dará al inicio de la amplificación

-Fase 2: Es la primera fase de la replicación. La primera fase del ciclo propiamente dicho. Tiene el mismo propósito que la Fase 1, la desnaturalización del ADN, pero en este caso se repetirá una vez por cada ciclo.

-Fase 3: Tras el desdoblamiento de la doble cadena de ADN, los *primers* se acoplan a la hebra de ADN a replicar. Estos marcan el punto de inicio de la replicación. Se dará una vez por cada ciclo.

-Fase 4: La última fase del ciclo. En ella se incrementa la temperatura para que la enzima ADN polimerasa se acople a la hebra de ADN a replicar, detrás del *primer* correspondiente, y comienza a unir los nucleótidos complementarios a los que componen la hebra original. Se dará una vez por cada ciclo.

-Fase 5: No considerada parte del ciclo. Tiene como función dar tiempo a la enzima ADN polimerasa para finalizar la replicación del ADN. Se dará una única vez al finalizar la totalidad de los ciclos deseados

-Fase 6: Fase de conservación

3.3.2.1 Material utilizado

El material utilizado en la amplificación del ADN de las muestras 3 y 4 es prácticamente el mismo que el utilizado en la amplificación anterior, tal y como se especifica en la Tabla 8.

Tabla 8: Materiales utilizados en la amplificación del ADN de las muestras 3 y 4.

Material	Cantidad	Especificaciones
Kit PuReTaq Ready-To-Go PCR Beads	1	-Bisturí -Reactivos generales PCR -Tubos PCR
Vortex	1	-Utilizado en el atemperado de reactivos -Utilizado en el proceso de mezcla
Centrífuga	1	-Utilizada en el proceso de mezcla
Tubos Eppendorf	10-12	
Micropipeta	1	-Volumen 0,2-20 µl
Puntas Pipeta	5-6	-Puntas desechables
Hielo	2 petacas	-Para conservar el ADN y los primers
Termociclador	1	
Ordenador	1	-Con el software 7500 v y conectado a la máquina de PCR

3.4 ANÁLISIS DEL ADN

La fase final de la identificación genética de los organismos objetivo es el análisis del ADN. En ella se procederá a comparar los resultados obtenidos en la fase de amplificación con el ADN de los controles positivos. Para ello se llevará a cabo la electroforesis; una técnica en la que se aplica una corriente eléctrica que fuerza al ADN, que tiene carga negativa, a desplazarse hacia el polo positivo a través de un gel que actúa como "tamizador", dejando circular el ADN según su tamaño y de esta forma clasificándolo según su carga y tamaño.

Esta técnica permite la comparación de las muestras con los patrones y controles, mostrando sus similitudes en tamaño aun siendo incapaz de indicar la especie concreta con la que se trabaja. Sin embargo, aporta la información necesaria para decidir si las muestras son enviadas a laboratorios especializados para su secuenciación o no.

En caso positivo las muestras serán enviadas a secuenciar, es decir a determinar la composición y el orden de nucleótidos en las partes de ADN analizadas, de forma que finalmente se identificarán las especies a las que pertenecen las muestras.

3.4.1 Análisis del ADN de las muestras 1 y 2

La electroforesis es una técnica laboriosa en la que se trabaja con preparaciones realizadas con anterioridad.

El primer paso es la preparación del gel, una mezcla de agua destilada y polisacáridos, principalmente agarosa, que constituirá la matriz de la electroforesis y que actúa como un filtro que clasificará las cadenas de ADN según su carga eléctrica y por ende su longitud.

Para ello se realizará en un molde rectangular una mezcla de *buffer* diluido en agua destilada, agarosa y “Midori green”, un tinte azul que permitirá ver los resultados de la electroforesis. Una vez la mezcla se solidifica, se retira del molde y se almacena.

La dilución del *buffer* se realiza a partir de 25 ml de 10XTAE diluidos en 225 ml de agua estéril, obteniendo 1XTAE.

También es necesario preparar las disoluciones con el ADN amplificado de las muestras y de los controles, en este caso el control 1 (*T. harzianum*) y el control 2 (*T. atroviride*). Se tomará el ADN amplificado, producto de la PCR y el de los controles y se mezcla con *loading buffer*, que brilla al ser expuesto a luz ultravioleta lo que permite observar el resultado del proceso.

Una vez el gel y las disoluciones están preparados, se procede a la realización de la electroforesis. Para ello se introduce el *Ladder*, patrón de pesos moleculares, del que se puede inferir el número de pares de bases, y las disoluciones del ADN de las muestras y de los controles en los pocillos de la parte superior del gel. Una vez hecho esto se aplica una corriente eléctrica de 100 V durante un periodo de 30 minutos. En la Tabla 9 se muestran todos los reactivos y elementos utilizados en la electroforesis.

Tabla 9: Preparaciones utilizadas y su composición. Electroforesis de las muestras 1 y 2.

Preparación	Composición	Cantidad Utilizada
Gel	-Agarosa 1,5 g -1XTAE 75 ml -“Midori green” 15 µl	-
Disolución muestra 1	-5µl ADN amplificado 1 -2µl <i>Loading buffer</i>	-5 µl Disolución muestra 1
Disolución muestra 2	-5µl ADN amplificado 2 -2µl <i>Loading buffer</i>	-5 µl Disolución muestra 2
Disolución Control 1 (<i>T. harzianum</i>)	-5µl ADN control 1 -2µl <i>Loading buffer</i>	-5 µl Disolución control 1
Disolución Control 2 (<i>T. atroviride</i>)	-5µl ADN control 2 -2µl <i>Loading buffer</i>	-5 µl Disolución control 2
Ladder	-5µl <i>Ladder</i>	-5 µl <i>Ladder</i>

Se obtuvo un resultado positivo ya que la sección de ADN amplificada en la muestra 1 presenta la misma longitud que la misma parte del ADN del control positivo número 1, correspondiente a *T. harzianum*. De la misma forma el ADN amplificado de la muestra 2 presenta el mismo tamaño aparente en la electroforesis que el control positivo número 2, perteneciente a *T. atroviride*.

3.4.1.1 Material utilizado

La realización de la electroforesis requiere el uso de material específico detallado en la Tabla 10.

Tabla 10: Materiales utilizados en la electroforesis y su preparación. Electroforesis de las muestras 1 y 2.

Material	Cantidad	Especificaciones
Micropipeta	1	-Volumen 0,2-20 μ l
Puntas de pipeta	6-8	
Bisturí	1	-Corte del gel
Tubos <i>Eppendorf</i>	9-12	
Hielo	2 petacas	- Para evitar la descomposición de muestras y controles
Cubeta de electroforesis y fuente de alimentación eléctrica	1	- Aplicación de corriente eléctrica
Parafilm	1	

3.4.2 Análisis del ADN de las muestras 3 y 4

El mismo proceso se va a seguir en el caso de las muestras 3 y 4. Mediante la electroforesis se va a estudiar si existen similitudes (tamaño aparente de las muestras y controles) suficientes entre los modelos y las muestras para enviar estas a secuenciar, con el fin de determinar con precisión la especie a la que pertenecen.

Para iniciar el proceso se elaborará el gel que actuará de matriz durante la electroforesis. Como en otros casos se preparará a partir de *buffer* diluido que se mezcla con agarosa y "Midori green" y se conservará en frío hasta su uso.

El *buffer* utilizado es el 1XTAE que se obtiene por la dilución de 25 ml de 10XTAE en 225 ml de agua estéril.

Por otro lado, se prepararán las muestras de ADN amplificado y el ADN control. Con el fin de hacer visible el material genético se mezcla con *loading buffer*, que brillará al ser expuesto a luz ultravioleta.

Otro componente esencial en la electroforesis es el *Ladder*, un índice que indicará el número de bases que componen el ADN amplificado. En la Tabla 11 se muestran todos los reactivos y elementos utilizados en la electroforesis.

Tabla 11: Preparaciones utilizadas y su composición. Electroforesis de las muestras 3 y 4.

Preparación	Composición	Cantidad Utilizada
Gel	-Agarosa 1,5 g -1XTAE 75 ml -"Midori green" 15 μ l	-
Disolución muestra 3	-5 μ l ADN amplificado 1 -2 μ l <i>Loading buffer</i>	-5 μ l Disolución muestra 1
Disolución muestra 4	-5 μ l ADN amplificado 2 -2 μ l <i>Loading buffer</i>	-5 μ l Disolución muestra 2

ANEJO III: IDENTIFICACIÓN GENÉTICA

Disolución Control 3 (<i>P. fluorescens</i>)	-5 µl ADN control 1 -2 µl <i>Loading buffer</i>	-5 µl Disolución control 1
Disolución Control 4 (<i>P. putida</i>)	-5 µl ADN control 2 -2 µl <i>Loading buffer</i>	-5 µl Disolución control 2
Ladder	-5 µl <i>Ladder</i>	-5 µl <i>Ladder</i>

Una vez los controles, las muestras y el gel están preparados se procederá a realizar la electroforesis propiamente dicha. Con una micropipeta se introducirán el *Ladder*, los controles y las muestras en el gel, de forma que en cada pocillo haya una única disolución. Seguidamente se aplicará una corriente eléctrica de 100 V durante 30 minutos que fuerza al ADN a desplazarse desde el polo negativo al positivo de forma que el gel actuará como filtro de los fragmentos de ADN, separando y clasificando los fragmentos según su longitud. Los resultados también fueron positivos, coincidiendo la longitud aparente de la muestra 3 con el control 3, perteneciente a *P. fluorescens* y la de la muestra 4 con el control 4, perteneciente a *P. putida*.

3.4.2.1 Material utilizado

Debido a que el proceso llevado a cabo para la preparación y consecución de la electroforesis es el mismo, los materiales son los mismos que los utilizados en el proceso de análisis de los hongos y se encuentra detallado en la Tabla 12.

Tabla 12: Materiales utilizados en la electroforesis y su preparación. Electroforesis de las muestras 3 y 4.

Material	Cantidad	Especificaciones
Micropipeta	1	-Volumen 0,2-20 µl
Puntas de pipeta	6-8	
Bisturí	1	-Corte del gel
Tubos <i>Eppendorf</i>	9-12	
Hielo	2 petacas	- Para evitar la descomposición de muestras y controles
Máquina electroforesis y fuente de alimentación eléctrica	1	-Aplicación de corriente eléctrica
Parafilm	1	

3.5 IDENTIFICACIÓN FINAL

Finalmente, y tras la obtención de resultados positivos en la electroforesis las muestras fueron enviadas a la empresa especializada STAB VIDA para su secuenciación, es decir para la determinación de la composición y orden de los nucleótidos de las partes amplificadas del ADN.

Los resultados fueron enviados por la empresa en un archivo comprimido zip. que contiene los documentos en distintos formatos (AB1, JPG, PHD, QUAL, SCF y SEQ). Una vez recibidos los documentos, se transformaron a formato FASTA para su uso en la herramienta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST), perteneciente al *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Esta herramienta permite la comparación de las secuencias de las muestras a identificar con las secuencias de su base de datos,

Alumno: Rodrigo Herrera Sanz

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (CAMPUS DE PALENCIA). E.T.S. de Ingenierías Agrarias

Titulación: Grado en Ingeniería Forestal y del Medio Natural

obteniendo coincidencias e identificando las especies a las que pertenecen las muestras.

3.5.1 Identificación final de las muestras 1 y 2

Los datos recibidos de la muestra 1 se transformaron a formato FASTA y se introdujeron en el BLAST que, tras un periodo de análisis, identificó la muestra como *Trichoderma harzianum* cepa BL7 con un porcentaje de identificación del 99,52 %, coincidiendo con lo esperado.

Se siguió el mismo procedimiento con la muestra 2, coincidente con el control número 2 en la electroforesis y obteniendo como resultado su identificación como *Trichoderma atroviride* cepa QT21978 18S con un porcentaje de identificación del 100 %.

Los resultados de la identificación de las muestras 1 y 2 se encuentran resumidos en la Tabla 13.

Tabla 13: Resumen de los resultados de la identificación de las muestras 1 y 2.

Nº muestra	Descripción	Puntuación máxima	Puntuación Total	Porcentaje de identificación	Adhesión
1	<i>T. harzianum</i> BL7 18S	1129	1129	99,52 %	KX343096.1
2	<i>T. atroviride</i> QT21978 18S	1109	1109	100,00 %	KY225624.1

3.5.2 Identificación final de las muestras 3 y 4

Los datos obtenidos de la muestra 3 se transformaron a formato FASTA, se introdujeron en la herramienta BLAST y se obtuvo la identificación de la muestra 3 como *Pseudomonas fluorescens* cepa PICF7 con un porcentaje de identificación del 99,00 %. Se llevó a cabo el mismo proceso con la muestra 4, que en la electroforesis coincidía con el control 4, *P. putida*, hecho que fue confirmado por la herramienta BLAST que identificó la muestra 4 como *Pseudomonas putida* cepa WAB1947 con un porcentaje de identificación del 99,20 %.

Los resultados de la identificación de las muestras 3 y 4 se encuentran resumidos en la Tabla 14.

Tabla 14: Resumen de los resultados de la identificación de las muestras 3 y 4.

Nº muestra	Descripción	Puntuación máxima	Puntuación Total	Porcentaje de identificación	Adhesión
3	<i>P. fluorescens</i> PICF7	2230	2230	99,00 %	MN208101.1
4	<i>P. putida</i> WAB1947 16S	2237	2237	99,20 %	AM208101.1

ANEJO IV: DISEÑO DE LA LÍNEA PRODUCTIVA

Índice del Anejo IV

1. PROTOCOLO A SEGUIR	1
1.1 <i>TRICHODERMA SPP.</i> : FACTORES LIMITANTES Y PROTOCOLO PRELIMINAR	1
1.1.1 Factores limitantes	1
1.1.1.1 Temperatura y pH	1
1.1.1.2 Otros parámetros	1
1.1.2 Producción en estado sólido de <i>T. harzianum</i> y <i>T. atroviride</i>	2
1.1.2.1 Protocolo a seguir	2
1.1.2.2 Resultados	4
1.1.2.3 Conclusiones	5
1.1.3 Protocolo preliminar	5
1.1.3.1 Temperatura y pH	6
1.1.3.2 Medio de cultivo	6
1.1.3.3 Agitación y aireación	7
1.1.3.4 Tiempo de cultivo	7
1.2 <i>PSEUDOMONAS SPP.</i> : FACTORES LIMITANTES Y PROTOCOLO PRELIMINAR	7
1.2.1 Factores limitantes	7
1.2.1.1 Temperatura y pH	8
1.2.1.2 Nutrición	8
1.2.1.3 Oxigenación	8
1.2.1.4 Otros parámetros	8
1.2.2 Protocolo Preliminar	8
1.2.2.1 Temperatura y pH	9
1.2.2.2 Nutrición	9
1.2.2.3 Oxigenación	9

ANEJO IV: DISEÑO DE LA LÍNEA PRODUCTIVA

1.2.2.4 Tiempo de cultivo	9
1.3 PROTOCOLO DEFINITIVO	10
1.3.1 Protocolo definitivo para <i>Trichoderma spp.</i>	10
1.3.2 Protocolo definitivo para <i>Pseudomonas spp.</i>	14
2. DIMENSIONADO DE LA LÍNEA DE PRODUCCIÓN	16
2.1 PREVISIONES DE PRODUCCIÓN	17
2.1.1 <i>Trichodermas spp.</i>	17
2.1.2 <i>Pseudomonas spp.</i>	19
2.2 DIMENSIONADO: FASE I	21
2.2.1 Dimensionado fase I: <i>Trichoderma spp.</i>	21
2.2.2 Dimensionado fase I: <i>Pseudomonas spp.</i>	22
2.3 DIMENSIONADO: FASE II	23
2.3.1 Dimensionado fase II: <i>Trichoderma spp.</i>	23
2.3.2 Dimensionado fase II: <i>Pseudomonas spp.</i>	24
2.4 DIMENSIONADO: FASE III	25
2.4.1 Dimensionado fase III: <i>Trichoderma spp.</i>	25
2.4.2 Dimensionado fase III: <i>Pseudomonas spp.</i>	26
3. DEFINICIÓN LÍNEA DE PRODUCCIÓN	26
3.1 DEFINICIÓN LÍNEA DE PRODUCCIÓN: <i>TRICHODERMA SPP.</i>	26
3.1.1 Línea de producción <i>Trichoderma spp.</i> : Fase I	26
3.1.1.1 Tamaño y capacidad	27
3.1.1.2 Control de la temperatura	27
3.1.1.3 Control del pH	27
3.1.1.4 Control de la oxigenación	27
3.1.1.5 Agitación	28
3.1.1.6 Otras características	28

ANEJO IV: DISEÑO DE LA LÍNEA PRODUCTIVA

3.1.2 Línea de producción <i>Trichoderma spp.</i> : Fase II	30
3.1.2.1 Tamaño y capacidad	30
3.1.2.2 Control de la temperatura	31
3.1.2.3 Control del pH	31
3.1.2.4 Control de la oxigenación	31
3.1.2.5 Agitación	31
3.1.2.6 Otras características	31
3.1.3 Línea de producción <i>Trichoderma spp.</i> : Fase III	32
3.1.3.1 Capacidad	33
3.1.3.2 Temperatura	34
3.1.3.3 Presión	34
3.1.3.4 Velocidad de enfriamiento	34
3.1.3.5 Otras características	34
3.2 DEFINICIÓN LÍNEA DE PRODUCCIÓN: <i>PSEUDOMONAS SPP.</i>	35
3.2.1 Línea de producción <i>Pseudomonas spp.</i> : Fase I	35
3.2.2 Línea de producción <i>Pseudomonas spp.</i> : Fase II	36
3.2.2.1 Tamaño y capacidad	36
3.2.2.2 Control de la temperatura	36
3.2.2.3 Control del pH	36
3.2.2.4 Control de la oxigenación	37
3.2.2.5 Agitación	37
3.2.2.6 Otras características	37
3.2.3 Línea de producción <i>Pseudomonas spp.</i> : Fase III	38
4. OTRAS CONSIDERACIONES	39
4.1 OTROS MATERIALES	39
4.2 CONSIDERACIONES LEGALES	40

1. PROTOCOLO A SEGUIR

El protocolo indica las condiciones necesarias para favorecer el óptimo crecimiento y desarrollo de los organismos objetivo. Por ello resulta esencial la definición exacta y rigurosa del protocolo a seguir en el proceso productivo.

El protocolo definirá los factores limitantes del desarrollo, por lo que determinará las condiciones de temperatura, pH, niveles de oxígeno, necesidad de nutrientes, agitación, exposición a la luz, salinidad y duración

Debido a intereses comerciales es difícil encontrar protocolos en uso por las compañías productoras de *Pseudomonas spp.*, *Trichoderma spp.* y otros organismos similares. Esto nos obliga a desarrollar nuestro propio protocolo, el cual será definido a partir de la bibliografía encontrada y de la información sobre las características de estos microorganismos, desarrollada en el Anejo I, además de a partir de las conclusiones obtenidas tras la experimentación con la producción en estado sólido, en el caso específico de *Trichoderma spp.*

En un primer momento se desarrollará un protocolo preliminar, el cual será testado y optimizado hasta la definición del protocolo definitivo.

1.1 TRICHODERMA SPP.: FACTORES LIMITANTES, PRODUCCIÓN EN ESTADO SÓLIDO Y PROTOCOLO PRELIMINAR

1.1.1 Factores limitantes

En el caso de las especies de *Trichoderma* que nos ocupan, los factores que más influyen en su desarrollo son la temperatura, el pH y la disponibilidad de oxígeno y nutrientes, quedando otros factores como la luz y la salinidad en un segundo plano.

Todos estos factores van a afectar la esporulación, la germinación y el crecimiento del hongo, viéndose la esporulación más afectada en ausencia de condiciones óptimas.

1.1.1.1 Temperatura y pH

En cuanto a la temperatura, a pesar de que la tolerancia térmica presentada es muy amplia, entre los 20 y los 40 °C para *T. harzianum* y entre los 12 y los 35 °C para *T. atroviride*, el rango óptimo de crecimiento se puede situar entre los 25 y los 30 °C para ambos (C. Petrisor, A. Paica & F. Constantinescu. 2016). Sin embargo, más allá de los 35 °C la esporulación no se va a producir y el crecimiento se reduce ligeramente.

El pH es otro de los factores con mayor influencia en los hongos. Tanto *T. harzianum* como *T. atroviride* requieren un pH ligeramente ácido, entre pH 5,1 y 6,1, de modo que su crecimiento y esporulación se ven reducidos en valores menores y mayores a este rango.

El pH va a influir en la disponibilidad de los nutrientes y minerales, afectando el metabolismo del hongo (C. Petrisor, A. Paica & F. Constantinescu. 2016).

1.1.1.2 Otros parámetros

Otro de los parámetros que influyen en el desarrollo y comportamiento de *T. harzianum* es el oxígeno disponible para la degradación de los nutrientes que constituyen fuentes de carbono y nitrógeno.

La salinidad no se considera un factor limitante en el desarrollo del hongo hasta alcanzar valores extremos (A. Zehra, M.K. Dubey, M. Meena & R. Upadhyay. 2017)

Por su parte la luz únicamente influye favoreciendo la conidiación en un proceso conocido como conidiación fotoinducida.

1.1.2 Producción en estado sólido de *T. harzianum* y *T. atroviride*

1.1.2.1 Protocolo a seguir

Como se ha determinado en el Anejo II la alternativa a aplicar en el diseño de la línea de producción, es la producción en estado líquido, debido a sus ventajas sobre otros tipos de producción. Sin embargo, y con el fin de ampliar el conocimiento sobre las cepas de hongos a utilizar se ha considerado adecuado realizar un ensayo de producción en estado sólido que aportará datos útiles para el diseño del protocolo final en estado líquido.

Para que esta experiencia sea útil, el protocolo a seguir debe presentar un bajo coste y completarse en un periodo de tiempo lo más corto posible, de forma que el desarrollo del proyecto no se vea ralentizado por este. Siguiendo esta idea, el protocolo teórico en estado sólido elegido requiere materiales accesibles y baratos y se extiende entre 12 y 15 días, dependiendo de la organización, la disponibilidad de los materiales y la naturaleza de las cepas. Sin embargo, en la práctica este protocolo se ha modificado ligeramente con el fin de adaptarlo a los medios de los que se dispone en el laboratorio del promotor; de esta forma se puede distinguir entre el protocolo teórico, del que se parte, y el protocolo práctico, el aplicado.

El protocolo teórico se divide en cuatro fases diferenciadas entre sí por su finalidad y extensión en el tiempo; estas son:

- Fase 1: Reproducción a de las cepas a utilizar. Se parte de los hongos inoculados e incubados previamente en una placa Petri con PDA a 25 °C durante 7-10 días con un ciclo de oscuridad/luz de 12 horas. Un trozo del PDA, alrededor de 0,5 gramos, se inocula en 250 ml de medio líquido PDB y se procede a su incubación, con una agitación de 150 rpm, a 25 °C durante 2 días.

- Fase 2: Preparación del medio de cultivo. Como medio de cultivo para este protocolo se van a utilizar arroz integral, trigo, centeno y cebada pudiéndose utilizar otros medios de bajo coste (Sorgo, Cáscara de tapioca, Hoja de plátano seca, etc...). Estos se hidratarán durante ocho horas dentro de bolsas de autoclave en una proporción de 100 g de cereal por 75 ml de agua común. Posteriormente se autoclavará a 121 °C durante 15 minutos.

- Fase 3: Crecimiento y producción en masa. Una vez preparado el medio de cultivo y los hongos se llevará a cabo la inoculación en una proporción de 10 ml de suspensión de *Trichoderma spp.* por cada 100 g de medio, mezclándolo bien para la dispersión uniforme del hongo. La mezcla se introducirá en bolsas zip con una abertura para permitir la entrada de aire y se dejará a temperatura ambiente (20-22 °C) durante 5 días para inducir la esporulación del hongo.

Una vez el hongo se ha desarrollado y esporulado es necesario realizar un conteo de las esporas viables presentes en este para que el producto final sea considerado como biofertilizante. La determinación del número de esporas viables se puede determinar mediante la espectrofotometría o con un hematocitómetro

Alumno: Rodrigo Herrera Sanz

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (CAMPUS DE PALENCIA). E.T.S. de Ingenierías Agrarias

Titulación: Grado en Ingeniería Forestal y del Medio Natural

ANEJO IV: DISEÑO DE LA LÍNEA PRODUCTIVA

- Fase 4: Formulación del producto final. En esta fase final surgen dos opciones; la primera de ellas consiste en triturar directamente la mezcla de medio de cultivo y esporas hasta conseguir un producto en forma de polvo que puede aplicarse directamente en el terreno o, por el contrario, se pueden separar las esporas del medio mediante su lavado y colado con agua estéril y una estameña, de forma que se obtendrá una suspensión de esporas y agua. Posteriormente se dejará secar la mezcla y se triturará obteniendo un polvo de esporas puras.

También, en aquellos casos en los que la densidad del hongo sea muy alta y/o la trituración del medio se considere innecesaria, se puede optar por no aplicar ninguna medida sobre la mezcla de medio-hongo, de forma que puede ser aplicada directamente en el suelo en ese estado.

Los materiales a utilizar en cada fase se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1: Materiales necesarios en el protocolo de producción en estado sólido.

Etapa del proceso	Materiales	Cantidad
Fase 1	Cultivo previo <i>T. harzianum</i> y <i>T. atroviride</i>	1 placa Petri de cada uno
	Bisturí	2 unidades
	Botes de cultivo (250 ml)	8 unidades
	PDB	1,8 l
	Mechero Bunsen	1 unidad
	Parafilm	15-20 unidades
	Agitador	1 unidad
Fase 2	Arroz integral	2,5 kg
	Trigo	2,5 kg
	Cebada	2,5 kg
	Centeno	2,5 kg
	Agua común	7,5 l
	Autoclave	1 unidad
	Bolsas autoclave	200 unidades
Fase 3	Bolsas zip	200 unidades
	Bandejas	2 unidades
Fase 4	Agua purificada	2 l
	Estameña	1 unidad
	Papel aluminio	1 rollo
	Trituradora	1 unidad

Por su parte el protocolo práctico se ha desarrollado en base al protocolo teórico, pero con ciertas modificaciones:

Fase 1: Reproducción de las cepas a utilizar

Se parte de *T. harzianum* y *T. atroviride* inoculados e incubados previamente en una placa Petri con PDA a 25 °C durante 7-10 días con un ciclo de oscuridad/luz de 12 horas. Cuatro trozos de PDA, colonizados por *T. harzianum* y otros cuatro trozos, colonizados por *T. atroviride*, alrededor de 0,5 g cada uno, se inoculan en 250 ml de medio líquido PDB y se procede a su incubación, con una agitación de 150 rpm, a 25 °C durante 2 días dentro de bolsas de plástico para evitar contaminaciones. De esta forma se obtienen 1 l de PDB colonizado por cada hongo.

Alumno: Rodrigo Herrera Sanz

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (CAMPUS DE PALENCIA). E.T.S. de Ingenierías Agrarias

Titulación: Grado en Ingeniería Forestal y del Medio Natural

ANEJO IV: DISEÑO DE LA LÍNEA PRODUCTIVA

Una vez pasado este tiempo los hongos se han desarrollado y han colonizado el medio líquido, generando numerosas colonias formadas únicamente por micelio, de forma redondeada debido a la agitación y un mucus con gran densidad de esporas y micelio.

Fase 2: Preparación del medio de cultivo

Simultáneamente se prepara el medio en el que el hongo se desarrollará en grandes cantidades para su producción. La proporción cereal agua a utilizar es de 1,34 kg de cereal a testar por cada litro de agua; en el caso particular de esta experiencia, se han tomado 2,5 kg de cada medio que se encuentran en bolsas de plástico con filtros de aire, de forma que el oxígeno puede penetrar en la bolsa, pero no existe riesgo de contaminación. En cada bolsa de 2,5 kg de medio se han añadido 1,87 l de agua común para su hidratación y, tras una espera de ocho horas, se ha separado del agua sobrante y se ha procedido a su esterilización introduciéndolo en el autoclave a una temperatura de 121 °C durante 15 minutos.

Una vez pasado este tiempo se ha roto la cubierta externa de los granos de cereal y el medio se encuentra completamente estéril, listo para la inoculación.

El agua obtenida a partir de cada uno de los medios, tras el autoclavado, se testó como medio de cultivo de los hongos, para determinar sus propiedades frente al PDB.

Fase 3: Crecimiento y producción en masa

Alrededor de dos días después del inicio del protocolo y una vez el medio de cultivo está hidratado y estéril y el inóculo del hongo está preparado se procede a su inoculación. Se añadieron 250 ml del inóculo por cada 2,5 kg del medio de cultivo, mezclándolo bien y repetidas veces para que el hongo se distribuya uniformemente por el medio. Posteriormente las bolsas se almacenan en presencia de luz y a una temperatura de 25-27 °C durante cinco días para asegurar la esporulación.

Fase 4: Formulación del producto final

Tras el desarrollo y la producción en masa de los hongos objetivo se procede a su formulación. En este punto se puede llevar a cabo una limpieza del producto o dejarlo en el mismo estado.

Finalmente, y debido a la gran cantidad de hongo formado se decidió no lavar ni triturar la mezcla de medio-hongo, acortando así el proceso. Únicamente se procedió al conteo de conidios para verificar que el número de estos propágulos satisface los estándares legales de los biofertilizantes.

Este proceso se llevó a cabo mediante el muestreo y análisis de 1 g de cada medio de cultivo que se sumergió en 20 ml de agua destilada para separar el hongo del medio y, finalmente, se realizó el conteo en una cámara *Neubauer*.

1.1.2.2 Resultados

Este protocolo se inició el día 27/01/2020 con la elección de los inóculos a reproducir, de forma que se seleccionaron inóculos de *T. harzianum* en PDA producidos el día 11/12/2019 y de *T. atroviride* en PDA producidos el día 20/12/2019. Estos fueron sometidos al proceso de reproducción de las cepas, explicado anteriormente.

ANEJO IV: DISEÑO DE LA LÍNEA PRODUCTIVA

Los medios elegidos fueron arroz integral, trigo, cebada y centeno los cuales se hidrataron y esterilizaron siguiendo el punto número dos del protocolo. Fueron inoculados el día 30/01/2020 y almacenados en las condiciones de luz y temperatura indicadas en el protocolo práctico. Finalmente, el día 6/02/2020, se realizó el muestreo y conteo de esporas el cual se llevó a cabo con una cámara *Neubauer*, formada por un cuadro central de 1 mm² de área, dividido en dieciséis cuadrantes y con una profundidad de 0,1 mm. Se procedió a contar las esporas localizadas en el interior de los cuadrantes de una de las diagonales.

Posteriormente se procedió a realizar el cálculo del número de propágulos por cada kilogramo de producto, utilizando la ecuación:

$$\text{propágulos/kg} = (n \div Vc) \times 1000 \times v \times 1000$$

Donde:

- n: Es el número medio de esporas registrado por cuadrante.
- v: Son los ml utilizados para disolver 1 g del medio. (v = 20 ml)
- Vc: Es el volumen de la cámara Neubauer. (Vc = 2,5x10⁻³ mm³)

El cálculo dio los resultados que se muestran en la Tabla 2 donde se puede comprobar que el producto final de forma que cumple sobradamente con los requerimientos legales para ser considerado como biofertilizante, establecidos en 10¹⁰ propágulos/kg por la legislación vigente (Real Decreto 999/2017).

Tabla 2. Resultados de la producción en estado sólido.

Medio	Esporas (n)	propágulos/kg
Arroz integral	18	1,44x10 ¹¹
Trigo	36	2,88x10 ¹¹
Cebada	27	2,16x10 ¹¹
Centeno	9	0,72x10 ¹¹

1.1.2.3 Conclusiones

Tras la finalización y el análisis de la producción en medio sólido se puede concluir que:

- Las cepas utilizadas presentan una gran capacidad de crecimiento, desarrollándose y alcanzando los estándares de calidad deseados en condiciones no óptimas.
- Los medios de cultivo con un alto contenido en proteínas favorecen el crecimiento del hongo.
- El agua de trigo obtenida tras el proceso de hidratación muestra grandes cualidades como medio de cultivo para los inóculos, constituyendo una alternativa barata y accesible al PDB.

1.1.3 Protocolo preliminar

En este apartado se van a diseñar los protocolos preliminares para *Trichoderma spp* y *Pseudomonas spp*, que se encuentran resumidos en la Tabla 3 y la Tabla 4 respectivamente y que servirán de punto de partida para su mejora y para la definición del protocolo final de cada una de las especies, siendo este último utilizado en el proceso de producción.

ANEJO IV: DISEÑO DE LA LÍNEA PRODUCTIVA

Para su diseño se tendrá en cuenta únicamente la información encontrada en la bibliografía y, si se considera necesario, se modificará de acuerdo a las conclusiones aportadas por la experiencia en estado sólido.

1.1.3.1 Temperatura y pH

Debido a que el rango óptimo de temperaturas se encuentra entre los 25 y 30 °C, se considera que la temperatura óptima para el protocolo preliminar debe ser de 30 °C.

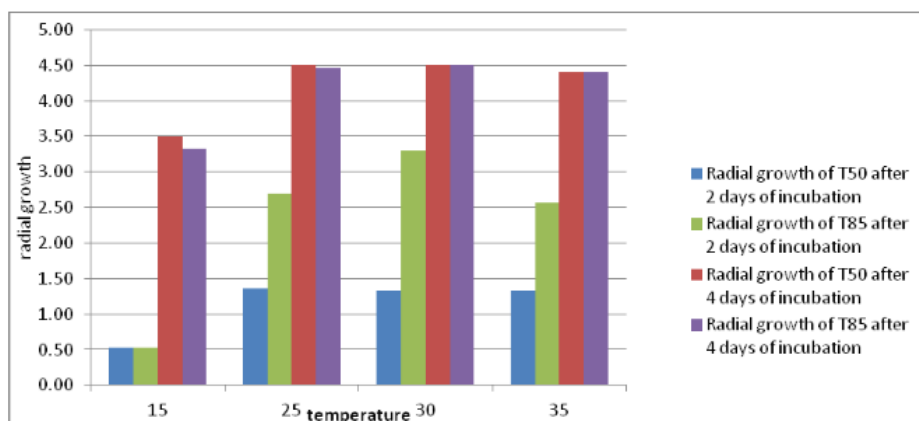


Figura 1: Crecimiento de *T.harzianum* a 15°C, 25°C, 30°C y 35°C en PDA. (C.Petrisor, A.Paica & F.Constantinescu. 2016)

Debido a la naturaleza ligeramente acidófila de *T. harzianum* y *T. atroviride*, el pH de partida tendrá un valor de pH 6.0 (M. Shahid et al. 2014.).

1.1.3.2 Medio de cultivo

Para la producción de *Trichoderma spp.* la bibliografía indica que el medio más adecuado es PDA/PDB, alcanzando crecimientos mayores a otros medios de cultivo como CA (Carrot Agar), CMA (Corn Meal Agar), WA (Water Agar), CWB (Coconut Water Broth) o RWB (Rice Washed Broth).

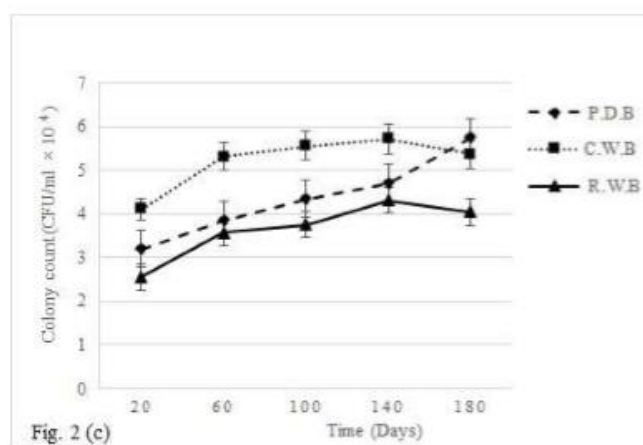


Figura 2: Número de colonias de *Trichoderma harzianum* en PDB, CWB y RWB.

ANEJO IV: DISEÑO DE LA LÍNEA PRODUCTIVA

Por ello se sugiere el uso del medio de cultivo PDB para su uso en el protocolo preliminar.

En la elección final del medio de cultivo se tendrá en cuenta la idoneidad del medio en el desarrollo del hongo, pero también su precio y rendimiento.

1.1.3.3 Agitación y aireación

Para conseguir una aireación óptima se va a realizar una agitación constante del cultivo, que favorecerá el nivel de oxígeno disponible por el hongo. La bibliografía nos indica que el valor óptimo de agitación es de 150 rpm, por lo que se aconseja este valor para el protocolo.

1.1.3.4 Tiempo de cultivo

En cuanto al tiempo de cultivo óptimo, no se ha encontrado información detallada sobre las especies que nos ocupan. Ciertos informes indican que el tiempo óptimo para el crecimiento de especies del mismo género (*T. koningii*) es de entre 14 y 16 días (C.M. Monreal. 2014), por lo que se aconseja este tiempo de cultivo para el protocolo preliminar, pudiendo modificarse en el protocolo final.

Finalmente, y a partir de la información recabada en los puntos anteriores, las condiciones en las que se desarrolla el protocolo preliminar se muestran en la Tabla 3. Se ha decidido que el protocolo preliminar conste de tres fases:

- Fase I. Producción del inóculo: En esta primera fase se crea, en un volumen reducido, el inóculo que servirá de colonia precursora en la fase de producción en masa. Este inóculo representará un quinto del volumen total que se quiere obtener al final de la fase de crecimiento.
- Fase II. Crecimiento: Parte principal de la producción. Una vez preparado el inóculo, este se añadirá en un volumen cinco veces mayor a su volumen original con el propósito de favorecer su crecimiento y desarrollo y así producir el hongo en grandes cantidades.
- Fase III. Formulación: Última fase del protocolo. Tras alcanzar el máximo crecimiento y esporulación del hongo, se procederá a su extracción y a la elaboración del producto final mediante el liofilizado de la mezcla hongo-medio.

Tabla 3: Tabla resumen de las condiciones del protocolo preliminar.

Temperatura	30 °C <i>T. harzianum</i> 25 °C <i>T. atroviride</i>
pH	6.0
Medio de Cultivo	PDA/PDB
Agitación	150 rpm
Tiempo de Cultivo	14-16 días

1.2 PSEUDOMONAS SPP.: FACTORES LIMITANTES Y PROTOCOLO PRELIMINAR

1.2.1 Factores limitantes

Por su parte *P. fluorescens* y *P. putida* presentan factores limitantes propios pero similares, debido a su cercanía taxonómica. Como ya se expuso en el Anejo I, presentan una gran resistencia con respecto a la temperatura, al pH y a la falta de nutrientes, pudiendo sobrevivir en condiciones extremas. Sin embargo, para alcanzar un crecimiento y desarrollo óptimos, se requieren condiciones muy específicas.

1.2.1.1 Temperatura y pH

P. fluorescens y *P. putida* destacan por su capacidad para soportar grandes rangos de temperatura, que abarcan desde los 4 °C hasta los 32 °C para *P. fluorescens* y hasta los 40 °C para *P. putida* (R. Noor, Z. Zeba & M.S. Munna. 2016).

Sin embargo la bibliografía indica que las temperaturas óptimas de crecimiento para *P. fluorescens* y *P. putida* son de 27 y 30 °C respectivamente.

En cuanto al valor del pH requieren valores ligeramente ácidos o neutros, incluidos en el rango entre 6 y 7, aumentando este a medida que aumenta la temperatura. Es importante destacar que, debido a su variabilidad genética, los valores óptimos de pH pueden variar de forma importante entre distintas cepas de la misma especie.

El valor óptimo del pH difiere entre ambas especies, de forma que *P. fluorescens* presenta un pH más ácido, en torno a 6,3 mientras que el de *P. putida* es neutro, con pH 7.

1.2.1.1.2 Nutrición

Debido a la naturaleza frugal de *Pseudomonas spp.* los requerimientos nutricionales no son especialmente exigentes. Si bien es cierto que requieren ricas fuentes de carbono y nitrógeno.

La bibliografía indica la glucosa y el sulfato amónico como buenas fuentes de carbono y nitrógeno respectivamente. Sin embargo, estudios más recientes indican que el glicerol y la peptona son más efectivos.

1.2.1.1.3 Oxigenación

P. fluorescens y *P. putida* son bacterias aerobias que utilizan el oxígeno como aceptor de electrones. Es por ello que el suministro constante y regular de oxígeno adquiere un papel esencial en el cultivo de estas bacterias.

Normalmente el suministro de oxígeno solo constituye un problema en el crecimiento de *Pseudomonas spp.* cuando no hay falta de nutrientes, por lo que puede considerarse un factor limitante importante, pero secundario.

1.2.1.1.4 Otros parámetros

Por último, cuando la disponibilidad de nutrientes no constituye un problema, la producción de metabolitos tóxicos, derivados de la nutrición va a constituir un factor limitante del crecimiento bacteriano. Estos metabolitos tóxicos, entre los que se

encuentra el peróxido de hidrógeno y diversos ácidos, disminuyen el pH e impiden el desarrollo de la población.

1.2.2 Protocolo preliminar

En este apartado se va a proceder al diseño de un protocolo preliminar que se utilizará como referencia y punto de partida para su mejora y para la definición del protocolo final, utilizado en el proceso productivo.

Para ello se tendrán en cuenta las necesidades y características de cada especie por separado para definir el protocolo más adecuado para cada especie.

1.2.2.1 Temperatura y pH

Teniendo en cuenta los requerimientos térmicos de ambas especies y tal y como se ha explicado anteriormente, se sugieren temperaturas de cultivo de 27 °C para *P. fluorescens* y de 30 °C para *P. putida*.

Anteriormente ya se ha explicado que el valor óptimo del pH varía significativamente incluso entre cepas de la misma especie, debido a la gran diversidad genética de las bacterias. Sin embargo, se pueden dar valores de referencia que constituirán el punto de partida para la determinación del valor óptimo del pH en nuestro caso.

En el caso de *P. fluorescens* se va a partir de un pH 6,3 mientras que para *P. putida* se va a partir de un pH 7.

1.2.2.2 Nutrición

Debido a los requerimientos nutricionales de los organismos que nos ocupan y al objetivo principal de optimizar la producción y disminuir costes se va a partir de un medio de cultivo simple, medio de cultivo líquido NB, que será complementado con un crioprotector, en este caso leche desnatada (1 % grasa) 12 % en volumen, para favorecer la conservación de la viabilidad de las bacterias en la fase final de la producción.

1.2.2.3 Oxigenación

Durante la incubación y fermentación de *P. fluorescens* y *P. putida* la disponibilidad de nutrientes no será un problema. Ello hace que factores secundarios como la disponibilidad de oxígeno se conviertan en factores limitantes de primer orden.

De esta forma se mantendrá el suministro de oxígeno artificialmente, manteniéndolo en valores atmosféricos del 20 % de oxígeno mediante una agitación de entre 100-150 rpm.

1.2.2.4 Tiempo de cultivo

Pseudomonas sigue el crecimiento propio de las bacterias. En inicio, se observa un crecimiento muy lento (*lag*) que se debe al proceso de adaptación al nuevo medio y condiciones, seguido de una fase de crecimiento exponencial, una fase estacionaria (no aumenta la población por la falta de nutrientes u otras razones) y la fase de decaimiento, en la que la población disminuye debido a la escasez de nutrientes o a la aparición de sustancias tóxicas derivadas del metabolismo de las bacterias.

ANEJO IV: DISEÑO DE LA LÍNEA PRODUCTIVA

La mayor parte de la bibliografía coincide en que la fase exponencial finaliza a las 16-20 horas (Hao Lin. 2015. Ohio State University), por lo que se recomienda que el proceso de cultivo finalice tras la fase exponencial. Esto permitirá la optimización de recursos.

Tras la revisión bibliográfica y el análisis de los factores limitantes, expuestos anteriormente, se va a proponer el siguiente protocolo para la producción de *P. fluorescens*.

Para el diseño del protocolo se definirán tres fases bien diferenciadas, la incubación, la fermentación y la formulación.

- Fase I. Incubación: En esta primera fase se va a desarrollar una primera colonia que constituirá el origen de la producción. Esta etapa del proceso puede ser realizada tanto en medio líquido, como en medio sólido. En este caso para el protocolo preliminar se propone su incubación en estado líquido.
- Fase II. Multiplicación: La fase principal del proceso productivo. Es en la que se va a desarrollar la colonia precursora, aumentando el número de individuos y su biomasa. Para ello se establecerán las condiciones óptimas para el crecimiento y desarrollo de la colonia. A diferencia de la incubación suele completarse en medio líquido.
- Fase III. Formulación: Fase final del proceso de producción en masa; en ella se somete el producto final a los procesos necesarios para su correcta preparación y conservación. Para este protocolo preliminar se propone el liofilizado.

Tabla 4: Tabla resumen del protocolo preliminar para *P. fluorescens* y *P. putida*.

Temperatura	<i>P. fluorescens</i> (27 °C) <i>P. putida</i> (30 °C)
pH	<i>P. fluorescens</i> (6,3) <i>P. putida</i> (7)
Medio de Cultivo	NA/NB Mejorado
Oxigenación	Oxígeno al 20 %
Agitación	150 rpm
Tiempo de Cultivo	32-40 horas

1.3 PROTOCOLO DEFINITIVO

Tras la realización de diversas pruebas y el testado de los protocolos preliminares, definidos anteriormente, se ha conseguido definir los protocolos definitivos para la producción de ambas especies de *Trichoderma spp.* y *Pseudomonas spp.* Estos protocolos se pueden considerar estándar de forma que, si se considera necesario, se pueden modificar las condiciones ligeramente para adaptar los organismos a las condiciones del medio en el que se van a aplicar; pero siempre dentro de los rangos de óptimo crecimiento para asegurar la máxima productividad.

1.3.1 Protocolo definitivo para *Trichoderma spp.*

Tanto *Trichoderma harzianum* como *Trichoderma atroviride* presentan unas características y un desarrollo similares, siendo hongos con un comportamiento parecido en el suelo, sin embargo, muestran ciertas diferencias en cuanto a sus condiciones óptimas de crecimiento. Por ello, sus respectivos protocolos se van a desarrollar simultáneamente, pero van a presentar ciertas variaciones.

Los protocolos de producción para estos hongos se organizan como el resto de protocolos sugeridos hasta el momento, divididos en tres fases diferenciadas por su naturaleza y objetivos.

- Fase I. Formación del inóculo y preparación del medio de cultivo: En esta fase inicial del proceso productivo se lleva a cabo un cultivo inicial del hongo con el fin de desarrollar la cepa que, posteriormente será producida en masa. Para ello, en el primer ciclo productivo se preparará un cultivo en placa de ambos hongos. Este se llevará a cabo, como se indica en la Tabla 5, en medio PDA (24 g/l) a 25 y 27 °C para *T. harzianum* y *T. atroviride* respectivamente, durante un periodo dos días con un pH neutro y con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas. Paralelamente se procederá a la preparación del medio de cultivo del inóculo, el agua de trigo. Para ello, se añadirá agua común al trigo en una proporción de 75 ml de agua por cada 100 gr de trigo, dejando que se hidrate durante 8 horas, tras lo cual el agua de trigo y los granos de cereal se separarán mediante filtrado. Posteriormente, se procederá a la esterilización del agua de trigo, introduciéndolo en el autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Una vez el inóculo inicial y el medio de cultivo están preparados, se procede a la inoculación del medio mediante la adición de 0,5 gramos de medio sólido PDA por cada 250 ml de agua de trigo, dentro de un biorreactor de pequeño tamaño y en condiciones controladas tal y como se muestra en la Tabla 6 para *T. harzianum* y *T. atroviride*. Una vez pasados dos días en las condiciones elegidas el inóculo necesario para iniciar la segunda fase del proceso productivo estará listo.

Tabla 5: Condiciones de incubación para *T. harzianum* y *T. atroviride* en medio sólido.

Especie	Medio	Temp. (C°)	Acidez (pH)	Oxigenación	Tiempo (días)
<i>T. harzianum</i>	PDA	27	7	20 %	2
<i>T. atroviride</i>	PDA	25	7	20 %	2

En posteriores ciclos una pequeña cantidad del inóculo producido en esta fase, 100-150 ml, será utilizada para reiniciar el ciclo, de forma que no se utilizará el hongo cultivado en PDA, a no ser que se considere necesario debido a la posible pérdida de capacidad de crecimiento, de generación de esporas en el medio líquido y/o tras el paso de un periodo de seis meses desde la formación del inóculo líquido. Es por ello que en condiciones normales la extensión de esta fase sea de dos días, aunque para el dimensionado posterior de la línea de producción, se considerarán cuatro días

Tabla 6: Condiciones de incubación para *T. harzianum* y *T. atroviride* en medio líquido.

Espece	Medio	Temp. (C°)	Acidez (pH)	Agitación (rpm)	Oxigenación	Tiempo (días)
<i>T. harzianum</i>	Agua de trigo	27	6	150	20 %	2
<i>T. atroviride</i>	Agua de trigo	25	6	150	20 %	2

- Fase II. Producción en masa: En esta fase principal del proceso productivo el inóculo producido durante la primera fase se desarrollará en un biorreactor de mayor volumen, aproximadamente veinte veces mayor, y en el mismo medio utilizado anteriormente, el agua de trigo, pero esta vez complementado con maltodextrina, en una proporción de 0,1 l de disolución de maltodextrina al 20 % por cada litro de medio. El resto de condiciones se mantendrán en valores óptimos y estarán controladas automáticamente por el biorreactor, con el principal objetivo de desarrollar la mayor cantidad de hongo posible y promover su esporulación, además de mantener la viabilidad de los conidios durante la conservación. Las condiciones de cultivo para cada hongo se encuentran resumidas en la Tabla 7.

Siguiendo los resultados de la experiencia en estado sólido, al final de esta fase se espera obtener en torno a $2,88 \times 10^{11}$ propágulos/l, un valor muy superior al exigido por la legislación vigente de 10^{10} propágulos/l.

Tabla 7: Condiciones de cultivo para *T. harzianum* y *T. atroviride*.

Espece	Medio	Temp. (C°)	Acidez (pH)	Agitación (rpm)	Oxigenación	Tiempo (días)
<i>T. harzianum</i>	Agua de trigo+M	27	6	150	20 %	7
<i>T. atroviride</i>	Agua de trigo+M	25	6	150	20 %	7

- Fase III. Formulación final: Constituye la última fase del proceso productivo. En ella se aplican los tratamientos y técnicas necesarios para garantizar la conservación y viabilidad del producto una vez sea aplicado por el cliente.

En el caso de *Trichoderma spp.* se va a llevar a cabo la alternativa elegida en el Anejo II, por la cual en esta fase se procederá al liofilizado a granel del resultado de la Fase II. Los frascos utilizados están específicamente diseñados para el proceso de liofilizado.

El proceso de liofilizado se compone de tres etapas encaminadas a eliminar la mayor cantidad de humedad posible para garantizar el éxito del proceso. Estas son:

ANEJO IV: DISEÑO DE LA LÍNEA PRODUCTIVA

Etapa I. Congelación: En esta primera parte del liofilizado el producto se va a enfriar por debajo de su temperatura eutéctica, con el fin de congelar todos los componentes de la solución. Al trabajar con *Trichoderma spp.* resulta conveniente llegar a la temperatura de congelación elegida lo más rápidamente posible, para obtener pequeños cristales de hielo que no romperán los tejidos del hongo, por lo que se reducirá a un ratio de $-1,5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$. La temperatura eutéctica considerada para hongos es de $-31\text{ }^{\circ}\text{C}$, por lo que es la elegida para este proceso.

Etapa II. Primer secado: En esta parte del proceso se va a reducir la presión del entorno para forzar la sublimación de la humedad congelada. Por tanto, las condiciones en esta etapa serán de $0,2\text{ mbar}$ y $-31\text{ }^{\circ}\text{C}$, extendiéndose durante un periodo de 20 horas.

Etapa III. Segundo secado: Posteriormente se procede a la evaporación de la humedad que no haya sublimado en la etapa anterior. Para ello, en las mismas condiciones de presión se aumenta la temperatura hasta llegar a su punto de evaporación, en este caso $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, extendiéndose durante 4 horas.

Posteriormente la presión se eleva hasta alcanzar la presión atmosférica y el producto obtenido se puede introducir en el embalaje esterilizado, con cuidado de no aumentar la humedad del producto, y almacenarlo a una temperatura constante de $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ en los que se entrega al cliente. Las condiciones y duración de cada etapa se encuentran sintetizadas en la Tabla 8.

Tabla 8: Etapas de la liofilización de *Trichoderma spp.*, condiciones y duración.

Etapa	Presión inicial (mbar)	Presión final (mbar)	Temperatura inicial ($^{\circ}\text{C}$)	Temperatura final ($^{\circ}\text{C}$)	Duración (horas)
Estado inicial	1013	1013	25/27	25/27	-
Etapa I	1013	1013	25/27	-31	0,62 <i>T. h</i> - 0,64 <i>T. a</i>
Etapa II	1013	0,2	-31	-31	20
Etapa III	0,2	0,2	-31	25	4
Estado final	0,2	1013	25	25	-
Total	-	-	-	-	24,62 <i>T. h</i> - 24,64 <i>T. a</i>

Con este proceso se espera conservar la viabilidad del 79 % y el 87 % de los conidios en *T. harzianum* y *T. atroviride*, respectivamente, inmediatamente después de finalizar el proceso de liofilización. Finalmente, el producto resultante será introducido en su embalaje esterilizado, con cuidado de no aumentar la humedad del producto, y almacenándolo a una temperatura constante de $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, de forma que se mantendrá el mayor nivel de viabilidad posible tras tres meses, cuando se espera que ronde el 8 % y el 10 % de conidios viables de *T. harzianum* y *T. atroviride*, respectivamente, con respecto al producto obtenido al final de la producción en masa, según la bibliografía (M.Czarnecka et al. 2018).

ANEJO IV: DISEÑO DE LA LÍNEA PRODUCTIVA

Para el cálculo de la duración del proceso productivo, se tomará la media de la duración de la Fase III de *T. harzianum* y *T. atroviride*, siendo esta de 24,63 horas.

Tras la finalización del proceso de formulación, el protocolo de producción se da por finalizado aproximadamente 14 días tras su inicio, tal y como muestra la Tabla 9.

Tabla 9: Duración parcial y total del protocolo de producción de *Trichoderma spp.*

Fase del protocolo	Duración (Días)
Fase I	4
Fase II	7
Fase III	1,02
Total	12,02

Tras la consecución del ciclo productivo se espera obtener una cantidad de materia seca que oscila entre los 27 y 35 gramos por litro de solución, variando según la concentración de la solución. En cálculos posteriores se utilizará el valor de 35 g/l.

1.3.2 Protocolo definitivo para *Pseudomonas spp.*

El protocolo a seguir en el caso de *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas putida* se va a desarrollar de forma paralela debido a su similitud en cuanto a su desarrollo y función en el suelo. Dado que el proceso que se describe es prácticamente el mismo, estos protocolos presentan la misma estructura que el de las dos especies de *Trichoderma spp.*, con la diferencia de que en este caso se trabaja con bacterias, organismos que presentan características y desarrollos completamente diferentes.

- Fase I. Formación del inóculo: Esta primera fase del protocolo de producción se centra en la creación de una pequeña colonia, precursora de la que se producirá posteriormente a mayor escala.
- Se realizará un cultivo en placa Petri y en medio sólido NA de la bacteria a producir, mediante raspado con punta de pipeta y se dejará crecer durante un periodo de 12-16 horas a una temperatura de 25 °C. Paralelamente se llevará a cabo la producción del medio de cultivo NB, utilizando 3 g extracto de levadura, 5 g de peptona y 5 g de sal por cada litro de medio a producir. Tras el desarrollo, se tomarán y añadirán 0,5 gramos de medio sólido colonizado por cada 250 ml de medio líquido a inocular, el cual ya se encuentra en el interior del biorreactor donde se formará el inóculo para las siguientes fases. Esta primera colonia se desarrollará durante 18 horas en condiciones controladas por el biorreactor, tal y como muestra la Tabla 10.

De la misma forma que en el caso anterior, al final de esta fase una pequeña cantidad de medio, entre 10 y 15 ml de NB colonizado por la bacteria será

reutilizado para inocular nuevo medio y reiniciar el proceso, evitando el uso de inóculos en medio NA, que solo se utilizará nuevamente en el caso de pérdida de cualidades por parte de las bacterias a producir y/o tras el paso de un periodo de seis meses desde la formación del primer inóculo líquido.

Tabla 10: Condiciones de incubación de *P. fluorescens* y *P. putida*.

Especie	Medio	Temp. (C°)	Acidez (pH)	Agitación (rpm)	Oxigenación	Tiempo (horas)
<i>P. fluorescens</i>	NB	27	6,3	150	20 %	18
<i>P. putida</i>	NB	30	7	150	20 %	18

- Fase II. Multiplicación: En esta fase del protocolo de producción se pretende estimular el desarrollo y reproducción del inóculo con el fin de obtener una colonia de mayor tamaño y producir en masa la bacteria en cuestión.
- El inóculo producido durante la fase anterior se verterá en un biorreactor de mayor tamaño y en una cantidad mayor de medio líquido NB+, en una proporción de inóculo-medio de 1/100. El proceso de multiplicación se llevará a cabo en condiciones controladas para optimizar el desarrollo bacteriano y finalizará una vez se alcance la fase estacionaria del desarrollo de las bacterias, que se estima entre 16 y 20 horas. El número de UFC que se espera obtener al final de esta fase es del orden de $2,1 \times 10^{11}$ UFC/l.

Las condiciones en las que la multiplicación se lleva a cabo se encuentran resumidas en la Tabla 11.

Tabla 11: Condiciones de la multiplicación de *P. fluorescens* y *P. putida*.

Especie	Medio	Temp. (C°)	Acidez (pH)	Agitación (rpm)	Oxigenación	Tiempo (horas)
<i>P. fluorescens</i>	NB+	27	6,3	150	20 %	18
<i>P. putida</i>	NB+	30	7	150	20 %	18

En este caso el medio utilizado, llamado NB+, está compuesto por medio NB convencional al que se le añade respectivamente un 12 % en volumen de leche desnatada (1 % de grasa), previamente esterilizada, para mantener la viabilidad de las bacterias en el tiempo.

- Fase III. Formulación: Finalmente y tras la multiplicación en masa de las bacterias, se llevará a cabo la formulación mediante el liofilizado a granel del producto. El procedimiento a seguir es similar al elegido en el caso anterior, aunque, debido a las características y naturaleza propias de *Pseudomonas spp*, ciertos parámetros van a cambiar.

Etapa I. Congelación: Una vez finalice el proceso de multiplicación, el producto obtenido se introducirá en frascos de liofilización y, partiendo de las condiciones anteriores, se procederá a su enfriamiento por debajo de la temperatura eutéctica, establecida en -32 °C, alcanzando finalmente los -34 °C y a un ratio de $-1,34$ °C/min. Con ello se busca congelar la humedad presente en el producto, dando lugar a pequeños cristales de hielo.

Etapa II. Primer secado: Tras llevar a cabo la congelación del producto se procederá a aplicar condiciones de vacío reduciendo la presión hasta los 0,2 mbar y así forzar la sublimación de la humedad congelada en el producto. Este estado se mantendrá durante 20 horas.

Etapa III. Segundo secado: Tras la sublimación de la mayor parte de la humedad en forma de hielo, se busca eliminar la humedad restante que se encontraba en estado líquido. Para ello, se aumentará la temperatura a 20 °C, manteniendo la presión en 0,2 mbar, durante un periodo de 18 horas.

Finalmente, tras la finalización del segundo secado se recuperará la presión original, presión atmosférica, y se introducirá el producto resultante en el embalaje que se vaya a utilizar, con cuidado de mantener el nivel de humedad del producto y se almacenará a una temperatura de 4°C.

Seguidamente los frascos utilizados en la liofilización serán esterilizados y reservados para siguientes usos.

Todo el proceso de formulación de *Pseudomonas spp*, se encuentra sintetizado en la Tabla 12.

Tabla 12: Etapas de la liofilización de *Pseudomonas spp*, condiciones y duración.

Etapa	Presión inicial (mbar)	Presión final (mbar)	Temperatura inicial (°C)	Temperatura final (°C)	Duración (horas)
Estado inicial	1013	1013	27/30	27/30	-
Etapa I	1013	1013	27/30	-34	0,76-0,80
Etapa II	1013	0,2	-34	-34	20
Etapa III	0,2	0,2	-34	20	18
Estado final	0,2	1013	20	20	-
Total	-	-	-	-	38,76 <i>P. f.</i> 38,80 <i>P. p.</i>

Tras la finalización de la fase de formulación se espera mantener la viabilidad del producto en valores alrededor del 32 % y 59 % para *P. fluorescens* y *P. putida*, respectivamente, con respecto al número de células viables tras la fase de producción en masa, llegando a mantener una viabilidad del 10 % y 18 % para *P. fluorescens* y *P. putida*, respectivamente, con respecto a su estado tras un año después de su producción en masa.

Para el cálculo de la duración del proceso productivo, se tomará la media de la duración de la Fase III de *P. fluorescens* y *P. putida*, siendo esta de 38,85 horas.

Como se muestra en Tabla 13, el protocolo de producción específico para *Pseudomonas spp*. tiene una extensión ligeramente mayor a 3 días.

ANEJO IV: DISEÑO DE LA LÍNEA PRODUCTIVA

Tabla 13: Duración parcial y total del protocolo de producción de *Pseudomonas spp.*

Fase del protocolo	Duración (horas)
Fase I	32
Fase II	18
Fase III	38,78
Total	88,78

Finalmente, tras completar el ciclo productivo se espera obtener 10,2 g de materia seca por litro de solución, lo que depende de la riqueza de la solución y la cantidad de colonias formadas.

2. DIMENSIONADO DE LA LÍNEA DE PRODUCCIÓN

Tras definir el protocolo de producción a seguir con cada una de las especies de *Trichoderma* y *Pseudomonas* a producir, y teniendo en cuenta todos los parámetros que influyen en su crecimiento, desarrollo y reproducción, el siguiente paso a tomar es el dimensionado de la línea de producción. A partir de la producción semanal o mensual proyectada se determinará el tamaño de la maquinaria requerida y la cantidad de reactivos a utilizar, de forma que la línea de producción quede definida a falta de elegir el modelo específico de cada dispositivo.

Siguiendo la dinámica del diseño del protocolo a seguir, se ha decidido dimensionar dos líneas de producción diferentes, diferenciando la destinada a producir *Trichoderma spp.* de la destinada a producir *Pseudomonas spp.* Esto se debe a la imposibilidad de compaginar la producción de hongos y bacterias en una única línea, debido a la duración de los protocolos de producción, a los procesos de esterilización que se deben llevar a cabo al cambiar el organismo a producir, y a la diferencia en las dimensiones de la maquinaria requerida para la producción de cada organismo.

2.1 PREVISIONES DE PRODUCCIÓN

Debido a que la legislación nacional e internacional, principalmente en la unión europea, cada vez es más restrictiva con respecto al uso de fertilizantes minerales, químicos y biocidas, la demanda de los compuestos denominados “biofertilizantes”, como los que ocupan el presente proyecto, ha aumentado enormemente durante los últimos años y se espera que lo siga haciendo en el futuro. Ello hace indispensable que el dimensionado de la línea de producción se ajuste a las previsiones actuales de producción, pero que además permita un incremento de la producción en el futuro, de forma que se pueda satisfacer la demanda del mercado sin grandes costes de actualización de la línea.

Actualmente las proyecciones de la empresa promotora indican una demanda del producto que permita tratar una superficie de alrededor de 80 ha/mes con una densidad de $1,44 \times 10^{11}$ propágulos/ha; sin embargo, muy probablemente esta demanda se incremente con el paso del tiempo.

2.1.1 *Trichoderma spp.*

Con respecto a *Trichoderma spp.* la legislación vigente indica en su Real Decreto 506/2013 y en sus modificaciones posteriores que, para ser considerado como biofertilizante y por tanto, actuar en el suelo como tal, se debe alcanzar con una

ANEJO IV: DISEÑO DE LA LÍNEA PRODUCTIVA

densidad de esporas del orden de 10^7 propágulos/g, o lo que es lo mismo, 10^{11} propágulos/ha, de forma que se garantiza el éxito del tratamiento y al mismo tiempo se mantiene la biodiversidad de la rizosfera. Hay que tener en cuenta que, debido a la pérdida de viabilidad de los conidios durante la fase de formulación y conservación, se requerirá una mayor producción.

En el caso de *T. harzianum* la producción requerida será sensiblemente mayor que la de *T. atroviride*, a pesar de que su desarrollo durante la fase de producción en masa se considera similar. Esto se debe a que la viabilidad de sus conidios se reduce en mayor grado tras su formulación y conservación y, de esta forma, *T. harzianum* va a permitir dimensionar la línea de producción, dado que es el organismo limitante.

Para iniciar el cálculo del volumen necesario a producir, se parte de las necesidades. La necesidad se calcula, para ambas especies de hongo, a partir de la fórmula:

$$N = S_t \cdot D_t$$

Donde:

-N: Necesidades. Se expresa como el número de propágulos necesarios por cada mes. (propágulos/mes)

-S_t: Superficie a tratar por periodo de tiempo. (ha/mes)

-D_t: Densidad del tratamiento. (Nº propágulos/ha).

De esta forma y teniendo en cuenta las previsiones del promotor de 80 ha/mes y la densidad elegida de $1,44 \times 10^{11}$ propágulos/ha:

$$N = 80 \frac{\text{ha}}{\text{mes}} \cdot (1,44 \times 10^{11}) \frac{\text{propágulos}}{\text{ha}} = 1,15 \times 10^{13} \frac{\text{propágulos}}{\text{mes}}$$

La producción mensual de unidades formadoras de colonia asciende a $1,15 \times 10^{13}$ propágulos/mes.

Seguidamente se necesita saber el número de ciclos que se podrán completar en cada mes y para cada especie. En este caso y dado que el protocolo de producción para *Trichoderma spp.* se extiende durante 12,56 días~13 días, se tiene que:

$$n_c = D \cdot (T_c)^{-1}$$

Donde:

-n_c: Número de ciclos que se pueden completar por mes. (Ciclos/mes)

-D: Número de días de cada mes. (30 días)

-T_c: Tiempo requerido para completar un ciclo productivo. (13 días)

$$n_c = 30 \frac{\text{días}}{\text{mes}} \cdot (13)^{-1} \frac{\text{días}}{\text{ciclo}} = 2 \frac{\text{ciclos}}{\text{mes}}$$

ANEJO IV: DISEÑO DE LA LÍNEA PRODUCTIVA

Por lo tanto, el número de ciclos productivos que se pueden completar para ambas especies es de 2 ciclos completos, lo que hace que se complete un único ciclo productivo completo para cada especie por mes.

Con estos datos se puede proceder al cálculo de la producción necesaria por cada ciclo productivo:

$$P_c = N \cdot (n_c)^{-1}$$

Donde:

- P_c : Producción necesaria por cada ciclo productivo (N^0 propágulos/ciclo)

- N : Necesidades mensuales. (N^0 propágulos/mes)

- n_c : Número de ciclos a completar por mes. (Ciclos/mes)

De forma que:

$$P_c = 1,15 \times 10^{13} \frac{\text{propágulos}}{\text{mes}} \cdot (1)^{-1} \frac{\text{ciclo}}{\text{mes}} = 1,15 \times 10^{13} \frac{\text{propágulos}}{\text{ciclo}}$$

Para el cálculo del volumen final que se necesita producir es necesario conocer el número de UFC que se producen y se consideran viables al final del protocolo definido anteriormente por cada litro de medio de cultivo. Para ello se utilizan los datos obtenidos en el proceso de producción en estado sólido en trigo, dado que es el medio a utilizar, resultando:

$$P_f = P \cdot C_v$$

Donde:

- P_f : Producción de propágulos viables al final del protocolo de producción, tras la formulación. (propágulos referidos a un litro de medio, aunque se encuentran en estado sólido)

- P : Producción de propágulos total, medido al final de la Fase II. (propágulos/l)

- C_v : Coeficiente de viabilidad tras la fase de formulación. (0,79- *T. harzianum*, 0,87- *T. atroviride*)

$$P_f = 2,88 \times 10^{11} \frac{\text{propágulos}}{\text{litro}} \cdot 0,79 = 2,27 \times 10^{11} \text{ propágulos (referidos a un litro de medio) } T. \text{ harzianum}$$

$$P_f = 2,88 \times 10^{11} \frac{\text{propágulos}}{\text{litro}} \cdot 0,87 = 2,50 \times 10^{11} \text{ propágulos (referidos a un litro de medio) } T. \text{ atroviride}$$

Finalmente, el cálculo del volumen a producir se realiza mediante la división de los propágulos que se necesitan producir por cada ciclo productivo entre los propágulos que se obtienen al final del ciclo productivo, referidas a un litro de medio:

$$V = P_c \cdot (P_f)^{-1}$$

Alumno: Rodrigo Herrera Sanz

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (CAMPUS DE PALENCIA). E.T.S. de Ingenierías Agrarias

Titulación: Grado en Ingeniería Forestal y del Medio Natural

$$V = 1,15 \times 10^{13} \frac{\text{propágulos}}{\text{ciclo}} \cdot (2,27 \times 10^{11})^{-1} \text{ propágulos} = 50,63 \text{ l para } T. \text{ harzianum.}$$

$$V = 1,15 \times 10^{13} \frac{\text{propágulos}}{\text{ciclo}} \cdot (2,50 \times 10^{11})^{-1} \text{ propágulos} = 45,98 \text{ l para } T. \text{ atroviride.}$$

Es importante tener en cuenta que los cálculos realizados anteriormente se han completado utilizando los rangos de producción más bajos, ya que el rendimiento del medio líquido es mayor y agrandando la extensión del ciclo productivo; todo ello encaminado a asegurar que la producción es suficiente para cubrir las necesidades y, de esta forma, sobredimensionando ligeramente el volumen necesario a producir.

2.1.2 *Pseudomonas spp.*

De la misma forma que se ha hecho anteriormente, se va a proceder a realizar el cálculo del volumen de *Pseudomonas spp.* necesario a producir para satisfacer la demanda proyectada por el promotor. El cálculo se realizará de una forma similar, partiendo de la superficie a tratar y la densidad de UFC requerida, hasta obtener el volumen necesario de la solución a producir. De esta forma se dimensionará la producción de ambas especies de bacteria, *P. fluorescens* y *P. putida*, teniendo en cuenta las peculiaridades de cada una de ellas, obteniendo el volumen de referencia para la elección de la maquinaria a utilizar.

En el caso de *Pseudomonas spp.* el Real Decreto 506/2013 y en sus modificaciones posteriores determinan que la concentración mínima del microorganismo en el producto fertilizante debe ser de 10^7 UFC/g, o lo que es lo mismo, 10^{10} UFC/ha. Paralelamente, la bibliografía aporta datos de densidad ligeramente mayores para tratamientos óptimos del suelo, por lo que se ha decidido tomar como referencia un valor de 8×10^{10} UFC por cada hectárea a tratar. Sin embargo, la superficie a tratar es la misma que la utilizada anteriormente, de forma que la producción tiene que satisfacer el tratamiento de 80 hectáreas de suelo por cada mes.

En el cálculo del volumen a producir se seguirá el mismo procedimiento que con *Trichoderma spp.* calculando las necesidades (N), el número de ciclos productivos que se pueden completar cada mes (n_c), la productividad necesaria de cada ciclo (P_c), la producción final de conidios viables (P_f) y, finalmente, el volumen a producir (V):

$$N = S_t \cdot D_t$$

$$N = 80 \frac{\text{ha}}{\text{mes}} \cdot (8 \times 10^{10}) \frac{\text{UFC}}{\text{ha}} = 6,4 \times 10^{12} \frac{\text{UFC}}{\text{mes}}$$

Donde:

- S_t : Superficie total a tratar. (ha/mes)
- D_t : Densidad de tratamiento elegida. (UFC/ha)

$$n_c = D \cdot T_c$$

$$n_c = 30 \frac{\text{días}}{\text{mes}} \cdot (3,70)^{-1} \frac{\text{días}}{\text{ciclo}} = 8,10 \frac{\text{ciclos}}{\text{mes}}$$

Donde:

Alumno: Rodrigo Herrera Sanz
 UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (CAMPUS DE PALENCIA). E.T.S. de Ingenierías Agrarias
 Titulación: Grado en Ingeniería Forestal y del Medio Natural

-D: Número de días por cada mes.

- T_c: Tiempo requerido para completar un ciclo productivo. (Días/ciclo)

El número de ciclos completos que se pueden realizar en un mes es de 8,10 de forma que para cada especie se pueden completar 4,05 ciclos (n_c) que se van a redondear a 4 para mayor seguridad.

$$P_c = N \cdot (n_c)^{-1}$$

$$P_c = 6,4 \times 10^{12} \frac{\text{UFC}}{\text{mes}} \cdot (4)^{-1} \frac{\text{ciclo}}{\text{mes}} = 1,6 \times 10^{12} \frac{\text{UFC}}{\text{ciclo}}$$

$$P_f = P \cdot C_v$$

$$P_f = 2,1 \times 10^{11} \frac{\text{UFC}}{\text{litro}} \cdot 0,32 = 6,72 \times 10^{10} \text{ UFC viables (referidas a un litro de medio) } P. \textit{ fluorescens}$$

$$P_f = 2,1 \times 10^{11} \frac{\text{UFC}}{\text{litro}} \cdot 0,59 = 1,24 \times 10^{11} \text{ UFC viables (referidas a un litro de medio) } P. \textit{ putida}$$

Donde:

-P_f: Número final de conidios viables tras la liofilización. (UFC)

-P: Producción media de conidios por cada litro. (UFC/litro)

-C_v: Coeficiente de viabilidad tras la liofilización (referido a un litro de medio).

$$V = P_c \cdot (P_f)^{-1}$$

$$V = 1,6 \times 10^{12} \frac{\text{UFC}}{\text{ciclo}} \cdot (6,72 \times 10^{10})^{-1} \text{ UFC} = 23,81 \text{ l } P. \textit{ fluorescens}$$

$$V = 1,6 \times 10^{12} \frac{\text{UFC}}{\text{ciclo}} \cdot (1,24 \times 10^{11})^{-1} \text{ UFC} = 12,90 \text{ l } P. \textit{ putida}$$

En este caso la especie que va a determinar el tamaño de la maquinaria a incorporar en la línea de producción es *P. fluorescens* ya que es la especie que mayor volumen de producción requiere. Hay que tener en cuenta que el cálculo del volumen necesario a producir para *Pseudomonas spp.*, al igual que en el caso anterior, se ha realizado siempre tomando los valores más bajos de producción y redondeando al alta la extensión del ciclo productivo; todo ello encaminado a asegurar que la producción cumpla con los estándares definidos por el promotor y con la demanda del producto.

Con estos datos se puede proceder a determinar la masa y volumen de las sustancias necesarias en cada fase del protocolo, además del tamaño mínimo de la maquinaria, principalmente los biorreactores, que se necesitan para la consecución de la producción.

2.2 DIMENSIONADO: FASE I

2.2.1 Dimensionado fase I: *Trichoderma spp.*

Tal y como se explica en el apartado 1.3.1 de este mismo anejo durante la primera fase del protocolo de producción se procederá a la elaboración del inóculo que, posteriormente en la fase II, será desarrollado dando lugar a la producción en masa de

Alumno: Rodrigo Herrera Sanz

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (CAMPUS DE PALENCIA). E.T.S. de Ingenierías Agrarias

Titulación: Grado en Ingeniería Forestal y del Medio Natural

ANEJO IV: DISEÑO DE LA LÍNEA PRODUCTIVA

T. harzianum y *T. atroviride*. Para ello, se va a realizar un cultivo previo de cada hongo en medio sólido PDA durante un periodo de dos días y en las condiciones expuestas en la Tabla 5. Posteriormente, el medio líquido elegido para el cultivo de los hongos, en este caso agua de trigo, será inoculado con el medio sólido PDA colonizado por los hongos y se continuará con el cultivo de estos durante dos días y en las condiciones que se muestran en la Tabla 6.

Para el dimensionado del inóculo en estado líquido y en estado sólido es necesario tener en cuenta el volumen de solución de cada hongo que se debe producir cada mes, ya que el inóculo en medio líquido constituye una fracción de la producción mensual.

En el apartado 2.1.1 se ha determinado que, para satisfacer la demanda de producto y los estándares de calidad, se necesita producir 51 l de solución de *T. harzianum* y 46l de solución de *T. atroviride*. Teniendo en cuenta el volumen total a producir, que el inóculo en estado líquido debe constituir 1/20 del volumen total a producir, y que se tiene que producir 100-150 ml a mayores para reiniciar el ciclo, se puede determinar el volumen del inóculo en estado líquido siguiendo la expresión:

$$V_i = V \cdot f_i + 0,15$$

Donde:

- V_i : Volumen del inóculo en estado líquido. (l)

- V : Volumen total a producir al final de la Fase II. (l)

- f_i : Factor del inóculo. La relación entre el volumen del inóculo y el volumen a producir. (1/20)

$$V_i = 51 \text{ l} \cdot (1/20) + 0,15 = 2,70 \text{ l inóculo líquido para } T. \text{ harzianum}$$

$$V_i = 46 \text{ l} \cdot (1/20) + 0,15 = 2,55 \text{ l inóculo líquido para } T. \text{ atroviride}$$

De esta forma y a partir del volumen del inóculo líquido necesario, se va a calcular el volumen del biorreactor para la fase I, la cantidad de inóculo en medio sólido, la cantidad de trigo que se necesita para completar esta primera fase del protocolo de producción.

Tal y como se explica en el apartado 1.3.1 la proporción de inóculo sólido a utilizar para la producción del inóculo líquido es de 2 gramos por cada litro de medio líquido, por lo que se llega a la conclusión de que se necesitarán 5,40 y 5,10 gramos de medio sólido para inocular *T. harzianum* y *T. atroviride* respectivamente. De la misma forma se indica que por cada 100 gramos de trigo se obtendrán 75ml de agua de trigo, por lo que se requieren 3,60 kg y 3,40 kg de trigo para producir el medio líquido de *T. harzianum* y *T. atroviride* respectivamente.

Tabla 14: Cantidades necesarias de inóculos y trigo durante la Fase I para *T. harzianum* y *T. atroviride*

Especie	Inóculo sólido (g)	Inóculo líquido (l)	Trigo (kg)
<i>T. harzianum</i>	5,40	2,55 + 0,15	3,60
<i>T. atroviride</i>	5,10	2,30 + 0,15	3,40

Alumno: Rodrigo Herrera Sanz

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (CAMPUS DE PALENCIA). E.T.S. de Ingenierías Agrarias

Titulación: Grado en Ingeniería Forestal y del Medio Natural

ANEJO IV: DISEÑO DE LA LÍNEA PRODUCTIVA

Finalmente, para dimensionar el biorreactor a utilizar en la Fase I del protocolo de *Trichoderma spp.* se utilizará el mayor volumen a producir dado que es el más restrictivo. Por ello, el volumen mínimo del biorreactor debe ser de 2,70l, por lo que se elegirá un biorreactor de mayor tamaño, siendo 3 litros el volumen comercial inmediatamente superior, más común.

2.2.2 Dimensionado fase I: *Pseudomonas spp.*

Para el dimensionado de la Fase I del protocolo de producción de *Pseudomonas spp.* se van a utilizar los resultados de los cálculos realizados anteriormente y las especificaciones expuestas en los apartados 2.1.2 y 1.3.2 de este mismo anejo. De esta forma, partiendo del volumen total a producir se va a calcular el volumen del inóculo en estado líquido, la cantidad de medio sólido necesario para el inicio del primer ciclo y el volumen del biorreactor a utilizar en esta fase.

El volumen a producir, en la fase de multiplicación, de solución de *Pseudomonas spp.* asciende a 16,96 l y 9,19 l para *P. fluorescens* y *P. putida* respectivamente. Teniendo en cuenta que, para la formulación del inóculo en estado líquido, se requiere 1/100 (f_i) del volumen total a producir, a lo que hay que sumar 15 ml más que actuarán de inóculo líquido con el que se reiniciará el ciclo. Siguiendo la expresión utilizada anteriormente se tiene que:

$$V_i = V \cdot f_i$$

$$V_i = 23,81 \cdot (1/100) = 0,2381 = 238 \text{ ml inóculo líquido para } P. \text{ fluorescens}$$

$$V_i = 12,90 \cdot (1/100) = 0,1290 = 129 \text{ ml inóculo líquido para } P. \text{ putida}$$

De la misma forma para el inicio del primer ciclo productivo se requiere un primer inóculo sólido, cultivado en medio NA para elaborar el inóculo líquido en NB. Anteriormente se decidió utilizar 0,5 gramos de inóculo sólido por cada 250 ml de medio líquido, por lo que finalmente se necesitarán 0,48 g y 0,26 g de inóculo sólido para *P. fluorescens* y *P. putida* respectivamente, por cada ciclo.

En este caso el volumen de inóculo líquido necesario para cada ciclo productivo es muy pequeño, lo que hace que no sea rentable la adquisición de un biorreactor únicamente para un ciclo, pero debido a que cada mes se completan 4 ciclos productivos con cada especie, se ha decidido elaborar los inóculos necesarios para todo el mes de una sola vez, de forma que se necesita alcanzar una producción de 0,967 l (0,952+0,015) y 0,531 l (0,516+0,015) de *P. fluorescens* y *P. putida* respectivamente.

Tabla 15: Cantidades necesarias de inóculo durante la Fase I para *P. fluorescens* y *P. putida*

Especie	Inóculo sólido NA (g)	Inóculo líquido NB (l)
<i>P. fluorescens</i>	1,93	0,95 + 0,015
<i>P. putida</i>	1,06	0,53+ 0,015

El volumen mayor para la formulación del inóculo va a ser el factor limitante en este caso, por lo que la capacidad del biorreactor a elegir viene condicionada por *P. fluorescens*. De esta forma el volumen del biorreactor debe ser mayor a 0,97 litros.

2.3 DIMENSIONADO: FASE II**2.3.1 Dimensionado fase II: *Trichoderma spp.***

En esta segunda fase del ciclo productivo se procede a la producción en masa de *Trichoderma spp.*, haciéndolo crecer y desarrollarse en un mayor volumen de medio de cultivo y en condiciones óptimas.

Para llevar a cabo esta fase se requieren los productos de la primera fase además de un mayor volumen de medio de cultivo líquido y el crio-protector, elegido anteriormente para *Trichoderma spp.*

El cálculo del volumen total a producir (V), realizado en el apartado 2.1.1, muestra la necesidad de producir un total de 50,63 l y 45,98 l de solución y un volumen de inóculo (V_i) de 2,55 l y 2,30 l de *T. harzianum* y *T. atroviride* respectivamente, de forma que el cálculo del volumen del medio líquido (V_M) a añadir se realiza como:

$$V_M = V - V_i$$

$$V_M = 50,63 \text{ l} - 2,55 \text{ l} = 48,08 \text{ l de medio líquido a añadir para } T. \text{ harzianum}$$

$$V_M = 45,98 \text{ l} - 2,30 \text{ l} = 43,68 \text{ l de medio a añadir para } T. \text{ atroviride}$$

Para la elaboración del medio de cultivo líquido a utilizar en esta segunda fase hay que dimensionar la cantidad de trigo necesaria, el volumen de agua a añadir y la cantidad de maltodextrina con la que se va a mejorar el medio.

En primer lugar y sabiendo que el volumen total de medio líquido a producir es de 48,08 l y 43,68 l, se puede calcular la cantidad de trigo necesaria (M_t), teniendo en cuenta que por cada 100 gramos de trigo se obtienen 75 mililitros de medio. De esta forma y siguiendo la ecuación se calcula la masa de trigo a utilizar:

$$M_t = V_M \cdot r$$

Donde:

-r: Relación trigo-agua. (0,1kg/0,075l)

Al aplicar la ecuación anterior se obtienen resultados de 64,11kg y 58,24 kg de trigo para *T. harzianum* y *T. atroviride* respectivamente.

Seguidamente se procede al cálculo de la cantidad (M_m) y volumen de maltodextrina (V_m) a añadir al medio, teniendo en cuenta que se calcula con respecto al volumen total a producir. Se ha determinado que la proporción de maltodextrina a añadir corresponde a 100 ml de maltodextrina (20 %) por cada litro de medio líquido, calculándose de la siguiente forma:

$$V_m = V \cdot p$$

Donde:

-p: Proporción de disolución de maltodextrina. (0,1l/l)

$$V_m = 50,63 \cdot 0,1 = 5,06 \text{ l de disolución de maltodextrina para } T. \text{ harzianum}$$

Alumno: Rodrigo Herrera Sanz
UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (CAMPUS DE PALENCIA). E.T.S. de Ingenierías Agrarias
Titulación: Grado en Ingeniería Forestal y del Medio Natural

$$V_m = 45,98 \cdot 0,1 = 4,60 \text{ l de disolución de maltodextrina para } T. atroviride$$

La riqueza de la disolución de maltodextrina asciende a un 20 %, por lo que las disoluciones de maltodextrina estarán compuestas por 1,01 kg de maltodextrina en polvo a la que se le añaden 5,06 l de agua destilada para *T. harzianum*, y por 0,92 kg de maltodextrina en polvo a la que se le añaden 4,60 l de agua destilada, para *T. atroviride*.

La tabla 16 muestra un resumen los elementos a utilizar en la Fase II y su cantidad:

Tabla 16: Masas y volúmenes de los elementos a utilizar en la Fase II para *T. harzianum* y *T. atroviride*

Especie	Maltodextrina sólida (kg)	Disolución Maltodextrina (l)	Trigo (kg)
<i>T. harzianum</i>	1,01	5,06	64,11
<i>T. atroviride</i>	0,92	4,60	58,24
Especie	Volumen inóculo (l)	Volumen agua de trigo a producir (l)	Volumen total en el biorreactor (l)
<i>T. harzianum</i>	2,55	48,08	55,69
<i>T. atroviride</i>	2,30	43,68	50,58

Finalmente, el volumen total (V_T) (Inóculo + Agua de trigo + Maltodextrina 20 %) que se encuentra en el interior del biorreactor es de 55,69~56 l en el caso de *T. harzianum* y de 50,58~51 l en el caso de *T. atroviride*. De esta manera el biorreactor elegido tendrá una capacidad mínima de 56 l, siendo 100 l el volumen comercial inmediatamente superior, más común.

2.3.2 Dimensionado fase II: *Pseudomonas spp.*

A continuación, se va a realizar el cálculo del volumen de los elementos que intervienen en la multiplicación de *Pseudomonas spp.* En esta fase se busca la multiplicación en masa de la bacteria en cuestión, por lo que se necesita conocer el volumen de medio de cultivo, del inóculo, del crio-protector y el tamaño mínimo del biorreactor a utilizar.

Para calcular el volumen de medio líquido NB a utilizar (V_m) en esta fase, se necesita conocer el volumen total a producir (V) y el volumen del inóculo (V_i) para cada especie, de forma que su diferencia será el volumen de NB a utilizar. Estos datos se han calculado anteriormente en el apartado 2.1.2 y 2.2.2 respectivamente, de forma que:

$$V_m = V - V_i$$

$$V_m = 23,81 - 0,24 = 23,57 \text{ l de medio NB para } P. fluorescens$$

$$V_m = 12,90 - 0,13 = 12,77 \text{ l de medio NB para } P. putida$$

Seguidamente se procede a calcular el volumen de leche desnatada (V_l) (1 % en materia grasa) a añadir al volumen total a producir. Anteriormente se determinó añadir un 12 % de este crio-protector al volumen total a producir, por lo que su volumen se calcula como:

$$V_i = V \cdot r$$

Siendo:

-r: Relación de volúmenes la producción total (V) y la leche desnatada (V_i) (0,12)

$$V_i = 23,81 \text{ l} \cdot 0,12 = 2,86 \text{ l de leche desnatada para } P. fluorescens$$

$$V_i = 12,90 \text{ l} \cdot 0,12 = 1,55 \text{ l de leche desnatada para } P. putida$$

De esta forma la suma de volúmenes en el interior del biorreactor (V_T) será ligeramente mayor a la producción total, tal y como muestra la Tabla 15:

Tabla 17: Relación de volúmenes en la fase de producción II para *P. fluorescens* y *P. putida*.

Especie	Volumen inóculo (l)	Volumen de medio (l)	Volumen crioprotector (l)	Volumen total (l)
<i>P. fluorescens</i>	0,24	23,57	2,86	26,67
<i>P. putida</i>	0,13	12,77	1,55	14,45

Como se puede observar en la Tabla 15, el volumen total (V_T) de *P. fluorescens* es el más alto de las especies de bacteria a producir, por lo tanto, este es el volumen que determina la capacidad mínima del biorreactor a utilizar para la línea de producción de *Pseudomonas spp.* siendo, como mínimo, de 26,67 litros.

2.4 DIMENSIONADO FASE III

2.4.1 Dimensionado fase III: *Trichoderma spp.*

La última fase del proceso productivo se centra en la formulación del producto mediante su liofilizado. El dimensionado de esta fase se va a llevar a cabo a partir de los datos obtenidos en apartados anteriores, considerados como las necesidades a cubrir, entre las que destacan la temperatura y presión a alcanzar durante el proceso y el volumen a formular.

Los condicionantes del proceso de liofilización se muestran en la tabla 18:

Tabla 18: Condicionantes del proceso de liofilización de *T. harzianum* y *T. atroviride*.

Especie	Temperatura máxima (°C)	Temperatura mínima (°C)	P. máx. (mbar)	P. mín. (mbar)	V. enfriado (°C/min)	Volumen total (l)
<i>T. harzianum</i>	25	-31	1013	0,2	-1,5	55,69
<i>T. atroviride</i>	27	-31	1013	0,2	-1,5	50,58

ANEJO IV: DISEÑO DE LA LÍNEA PRODUCTIVA

De esta forma la maquinaria a elegir para la formulación de *T. harzianum* y *T. atroviride* debe ser capaz de cubrir las necesidades expuestas en la Tabla 18.

2.4.2 Dimensionado fase III: *Pseudomonas spp.*

En la formulación de *Pseudomonas spp.* se llevará a cabo la liofilización de la solución obtenida tras la Fase II del proceso productivo. Como en el caso de *Trichoderma spp.*, el dimensionado de esta fase va a estar condicionado por los valores de temperatura y presión a alcanzar durante el liofilizado, la velocidad de enfriado y el volumen total a procesar. Estos datos se exponen en la Tabla 19.

Tabla 19: Condicionantes del proceso de liofilización de *P. fluorescens* y *P. putida*.

Especie	Temperatura máxima (°C)	Temperatura mínima (°C)	P. máx. (mbar)	P. mín. (mbar)	V. enfriado (°C/min)	Volumen total (l)
<i>P. fluorescens</i>	27	-40	1013	0,2	-1,34	33,33
<i>P. putida</i>	30	-40	1013	0,2	-1,34	18,07

La maquinaria a elegir para el liofilizado de *Pseudomonas spp.* debe cubrir las necesidades mostradas en la Tabla 19.

3. DEFINICIÓN DE LA LÍNEA DE PRODUCCIÓN

Tras el diseño del protocolo de producción a seguir y el dimensionado de cada una de las fases del proceso productivo, se va a proceder a la definición y descripción de la maquinaria que conformará la línea de producción y que desarrollará un papel esencial en el proceso productivo.

3.1 DEFINICIÓN DE LA LÍNEA DE PRODUCCIÓN: *TRICHODERMA SPP.*

3.1.1 Línea de producción *Trichoderma spp.*: Fase I

En la primera fase del ciclo productivo el biorreactor elegido para la producción del inóculo líquido va a desarrollar un papel esencial, dado que de él dependerá en gran medida el éxito del proceso de producción.

En apartados anteriores ya se han definido los requerimientos esenciales de tamaño y volumen, que este biorreactor debe cumplir, a los que se añaden los siguientes:

- Temperatura: Control preciso de la temperatura en el interior del biorreactor, siendo esta de 27 °C para *T. harzianum* y de 25 °C para *T. atroviride*.
- pH: Mantenimiento del nivel de acidez del medio de cultivo en un valor de pH neutro.
- Oxigenación: Mantenimiento del nivel de oxígeno disuelto en un valor del 20 %.

- Agitación: Agitación continua de la solución a una frecuencia de 150 revoluciones por minuto.

Tras el análisis y comparación de diversos modelos pertenecientes a distintos productores y suministradores de este tipo de maquinaria, se ha elegido el modelo de biorreactor/biofermentador F1 MB-3, de 3 litros de capacidad, producido por firma empresa Bionet.

3.1.1.1 Tamaño y capacidad

El modelo elegido presenta un volumen total de 4,3 litros, con unas capacidades máximas y mínimas de trabajo de 3 y 0,65 litros respectivamente. Con respecto a sus dimensiones el tanque tiene una altura de 35,90 cm, un diámetro exterior de 17,50 cm y uno interior de 15,60 cm, con el fondo de forma elíptica.

3.1.1.2 Control de la temperatura

Las temperaturas de trabajo para las que está diseñado el biofermentador oscilan entre los 5 °C y los 130 °C, siendo la temperatura máxima y mínima que puede alcanzar de 150 °C y 5 °C respectivamente. La temperatura está controlada por una sonda de temperatura de 10 mm de diámetro, con una precisión de $\pm 0,01$ °C. El calentamiento del medio se realiza de forma eléctrica con un calentador de 300 W, mientras que el enfriamiento se lleva a cabo mediante bombeo de agua fría a través de una varilla refrigerante de 19 mm de diámetro.

3.1.1.3 Control del pH

Los valores de pH del medio de cultivo se controlan gracias a una sonda de pH de 12 mm de diámetro con un rango de trabajo entre 1 y 14 y $\pm 0,01$ valores de precisión. Para ajustar el pH a los valores estipulados se lleva a cabo el bombeo de ácidos (HCl) y/o bases (KOH) de forma automática, hasta alcanzar el valor ideal. Estas bombas trabajan hasta a 30 rpm, con velocidades de bombeo de entre 4,2 – 25,5 ml/min.

3.1.1.4 Control de la oxigenación

El control del oxígeno disuelto en el medio de cultivo (dO_2) está garantizado gracias una sonda de dO_2 , de 12 mm de diámetro con un rango de trabajo que oscila entre el 0 % y el 100 % de oxígeno disuelto y que presenta una precisión del $\pm 0,01$ %, asegurando que el nivel de oxígeno se mantiene en el valor deseado mediante el bombeo de aire a través de un distribuidor de gas de 10 mm de diámetro.

3.1.1.5 Agitación

La agitación del medio se realiza de forma continua gracias a un agitador con un motor síncrono de funcionamiento servo con sellado mecánico de 0,37 kW y un rango de trabajo que abarca entre 0 y 2000 rpm. Está conectado a dos turbinas tipo Rushton con

ANEJO IV: DISEÑO DE LA LÍNEA PRODUCTIVA

6 palas que, combinadas con 4 deflectores, aseguran la agitación homogénea del medio de cultivo.

Adicionalmente incorpora un detector de espuma de 10 mm de diámetro.

3.1.1.6 Otras características

Además de las mencionadas anteriormente el modelo de biofermentador elegido para la primera fase de producción de *Trichoderma spp.*, presenta características adicionales, mostradas en la Tabla 20, que hay que tener en cuenta.

Tabla 20: Características adicionales del modelo de biorreactor F1 MB-3.

Instrumentación y control	
Software	R.O.S.A.+
FCU	Externo (36An x 84Al x50F cm) de 50 kg
Comunicación	2 x puertos Ethernet (LAN y VPN) 1 x puerto USB
Automatización	PLC Industrial (Siemens) + Módulos E/S Panel PC táctil 12" SVGA 800 x 600
Puertos	
Número total de puertos	12
Puertos Ø 19 mm	Varilla refrigerante Boquilla de adición cuádruple
Puertos Ø 12 mm	Sensor de pH Sensor de oxígeno disuelto Instrumentos de recambio
Puertos Ø 10 mm	Sensor de temperatura Puerto de repuesto Detector de espuma Puerto de muestreo Distribuidor de gas
Otros puertos	Agitador
Materiales	
Material del tanque	Vidrio borosilicato
Material estructura externa	Acero inoxidable A316L y A304
Material de la FCU	Acero inoxidable A304
Otras características	
Número de bombas	3x 30rpm velocidad fija 4,2 – 25,5 ml/min 1x 30rpm velocidad fija 2,1 - 25,5 ml/min
Filtros de gases de salida	1
Tamaño total (Tanque + FCU)	93,5 cm (An) x 84,0 cm (Al) x 50,0 cm (F)
Servicios	
Inspección previa a la entrega (Tests IC/OC)	
Embalaje a cuenta de Bionet	
Entrega y transporte realizados por Bionet o empresas colaboradoras	
Montaje incluido en las instalaciones del cliente	
Curso de utilización en las instalaciones de Bionet (adicional)	

ANEJO IV: DISEÑO DE LA LÍNEA PRODUCTIVA

De esta forma el biorreactor F1 MB-3 cumple con las exigencias básicas del proyecto y adicionalmente ofrece unas capacidades y servicios que facilitarán la consecución de esta fase del ciclo productivo. Debido a la función desempeñada por el biorreactor como productor del inóculo con el que se inicia el ciclo, se requiere su esterilización tras cada proceso de producción, dado que no dispone de un sistema de esterilización propio. Por ello, es necesaria la adquisición de un esterilizador autoclave capaz de tratar con los materiales que conforman el biofermentador y con una capacidad suficiente. También es importante recordar que en fases posteriores del proceso productivo este autoclave va a ser utilizado para esterilizar el medio de cultivo a utilizar, hasta 55,69 litros, por lo que también debe satisfacer esta necesidad. De esta forma el modelo elegido debe cumplir:

- **Medidas internas:** La cámara de esterilización debe tener un tamaño mínimo 22 cm de anchura, 46 cm de altura y 22 cm de profundidad.
- **Volumen interior:** El volumen de la cámara de esterilización debe ser capaz de albergar los contenedores que se utilicen en la esterilización del medio de cultivo.
- **Materiales de trabajo:** Debe ser capaz de trabajar con materiales como acero inoxidable y cristal borosilicato, que componen el biofermentador, y polipropileno, que compone los contenedores de esterilización del medio de cultivo.

Siguiendo estos requerimientos se ha elegido como modelo de esterilizador autoclave el modelo celitron A-456, esterilizador de vapor de gran tamaño; siendo sus características las mostradas en la Tabla 21:

Tabla 21: Características del esterilizador autoclave a vapor celitron A-456.

Tamaño	
Dimensiones internas cámara (cm)	50 (An) x 50 (Al) x 73,5 (F)
Volúmen cámara (l)	180
Dimensiones externas (cm)	97 (An) x 181 (Al) x 101 (F)
Peso (kg)	550
Potencia	
Potencia total (kW)	20
Potencia generador vapor (kW)	18
Potencia sin generador (kW)	2
Suministro eléctrico	
Tensión (V)	380 - 400
Frecuencia (Hz)	50 - 60
Otras características	
Ciclos de esterilización disponibles	Flash 134°C/ Sin envolver 134°C/ Envuelta 134°C/ Priones 134°C/ Porosa 121°C
Extensión de los ciclos	A partir de 21 minutos
Pantalla táctil	LCD 5,7" Gráficos en color
Material	Acero inoxidable 316L
Puertas	1 o 2 puertas verticales corredizas

Tal y como muestra la tabla anterior el modelo elegido cumple con los requerimientos técnicos para cumplir con su función en el proceso productivo.

3.1.2 Línea de producción *Trichoderma spp*: Fase II

Durante la segunda fase del protocolo se procede a la producción en masa de los propágulos de las especies objetivo, realizándose en el interior de un biorreactor diseñado específicamente para ello. Este proceso se debe realizar en las condiciones óptimas de crecimiento, determinadas en apartados anteriores de este mismo anejo, y en cantidad suficiente para satisfacer la demanda de producto. Por ello, el biofermentador elegido debe cumplir con las siguientes exigencias:

- **Tamaño:** Debe ser capaz de producir la cantidad proyectada de propágulos, por lo que su capacidad debe ser igual o mayor a 55,69 litros.
- **Temperatura:** La temperatura debe ser controlada y mantenida de forma precisa entorno a los valores elegidos para cada especie, 27 °C para *T. harzianum* y de 25 °C para *T. atroviride*.
- **pH:** Los niveles de pH en el interior del medio de cultivo deben poder ser controlados y modificados, en caso necesario. Se deben mantener en valores de pH 6 para ambas especies.
- **Oxigenación:** El nivel de oxígeno disuelto debe mantenerse al 20 % para garantizar el éxito de esta fase.
- **Agitación:** Se debe mantener una agitación constante, de 150 rpm de forma que haya una distribución uniforme del hongo en el interior del medio de cultivo.

Siguiendo los criterios anteriores se ha decidido utilizar en esta segunda fase el modelo de biorreactor F3 MB-100, de 100 litros de capacidad, diseñado y producido por la compañía Bionet, del que se desarrollan sus características a continuación.

3.1.2.1 Tamaño y capacidad

Este modelo de biofermentador ofrece una capacidad total de 143 litros, siendo las capacidades máximas y mínimas de trabajo de 100 y 25 litros respectivamente. En cuanto a su tamaño, el tanque del biorreactor presenta una altura de 120,6 cm y un diámetro exterior de 40,6 cm.

3.1.2.2 Control de la temperatura

El control de la temperatura en el interior del tanque se lleva a cabo gracias a un sensor de temperatura de 3,81 cm de diámetro situado en la parte inferior del tanque. Las temperaturas de trabajo oscilan entre los 5 y los 130 °C, con una precisión de $\pm 0,01$ °C. Los ajustes de temperatura se realizan a través de un sistema de recirculación, por el que se conduce agua fría para el enfriamiento del tanque o vapor de agua para calentarlo.

Alumno: Rodrigo Herrera Sanz

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (CAMPUS DE PALENCIA). E.T.S. de Ingenierías Agrarias

Titulación: Grado en Ingeniería Forestal y del Medio Natural

3.1.2.3 Control del pH

Los niveles de pH se monitorizan gracias a un puerto de control de pH Ingold de 2,5 cm de diámetro, detectando valores de pH entre 0 y 14 y una precisión de $\pm 0,01$. En caso de necesidad, el pH se reajusta mediante el bombeo de bases (KOH) o ácidos (HCl) de forma automática, hasta alcanzar el valor estipulado. Este bombeo se lleva a cabo a través de una de las bombas peristálticas que incorpora, con un ritmo de trabajo de hasta 220 rpm y un caudal de hasta 190 ml/min.

3.1.2.4 Control de la oxigenación

El oxígeno disuelto en el medio de cultivo se controla gracias a un puerto de control de dO_2 Ingold de 2,5 cm de diámetro, con un rango de detección entre el 0 y el 100 % y una precisión del $\pm 0,01$ %. Los ajustes del nivel de oxígeno disuelto, en caso de ser necesarios, se realizan por bombeo de aire a través de un puerto de 0,95 cm de diámetro situado en la parte superior del tanque.

3.1.2.5 Agitación

El biorreactor lleva incorporado un agitador conectado a la parte inferior del tanque por un puerto de 18 cm de diámetro. El agitador se compone de un motor eléctrico de 2,2 kW de potencia que trabaja entre 100 y 800 rpm, conectado a tres turbinas Rushton con 6 palas cada una. Adicionalmente se puede controlar el nivel de espuma producida, gracias a un detector de espuma situado en la tapa del tanque de 3,81 cm de diámetro.

3.1.2.6 Otras características

Además, este modelo de biorreactor ofrece otras características, mostradas en la Tabla 22, a tener en cuenta:

Tabla 22: Características adicionales del modelo de biorreactor F3 MB-100.

Instrumentación y control	
Software	R.O.S.A.+
FCU	Integrado en la estructura
Comunicación	2 puertos Ethernet (LAN y VPN) 2 entradas analógicas externas configurables 1 salida analógica externa configurable 1 RS485 para comunicación con elementos externos
Automatización	Industrial PLC (Siemens) + Módulos E/S. Panel PC táctil 12" SVGA 800 x 600
Puertos	
Número total de puertos	24
Puertos Ø 6,35 cm	Puerto de repuesto
Puertos Ø 5 cm	Cristal de observación
Puertos Ø 3,81 cm	Condensador de gas Detector del nivel de espuma

ANEJO IV: DISEÑO DE LA LÍNEA PRODUCTIVA

	6 puertos de adición y pruebas Manómetro Disco de expansión Mecanismo de muestreo Transmisor de temperatura
Puertos Ø 3 cm	4 puertos de adición
Puertos Ø 2,5 cm	Sensor de oxígeno disuelto Sensor de pH Puerto de repuesto Válvula de recogida tipo diafragma
Otros puertos	Agitador Ø 18 cm Cristal vertical de observación
Materiales	
Material del tanque	Acero inoxidable A316L con fondo Kloppler y cristal borosilicato
Material de la FCU	Acero inoxidable A304 acabado mate
Material de la estructura	Acero inoxidable A304
Otras características	
Número de bombas	3 bombas peristálticas con velocidades de hasta 220 rpm y caudal de 190 ml/min
Esterilización	Sistema de esterilización automático
Tamaño total (Tanque+ FCU+ estructura)	150 cm (An) x 227,73 cm (Al) x 83 cm (F)
Servicios	
Inspección previa a la entrega (Tests IC/OC)	
Embalaje a cuenta de Bionet	
Entrega y transporte por Bionet o empresas colaboradoras	
Montaje incluido en las instalaciones del cliente	
Curso de utilización en las instalaciones de Bionet (adicional)	

Tras el análisis de las características del biofermentador F3 MB-100, se determina que cumple con todos los requerimientos del proyecto.

Para el inicio de esta segunda fase del ciclo es necesario esterilizar el medio de cultivo a utilizar. Para ello, se utilizará el modelo de esterilizador autoclave celitron A-456, elegido anteriormente, y cuyas especificaciones se muestran en la Tabla 21.

3.1.3 Línea de producción *Trichoderma spp.*: fase III

Esta última fase del ciclo productivo está centrada en la formulación y conservación. Para ello se ha decidido llevar a cabo la liofilización del producto final, para conservar su viabilidad durante largos periodos de tiempo. Este proceso se llevará a cabo gracias a un dispositivo liofilizador que, debido a sus características, será utilizado tanto para la línea de producción de *Trichoderma spp.*, como para la línea de producción de *Pseudomonas spp.*

De esta forma, el modelo de liofilizadora a elegir debe cumplir con las siguientes características:

Alumno: Rodrigo Herrera Sanz
UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (CAMPUS DE PALENCIA). E.T.S. de Ingenierías Agrarias
Titulación: Grado en Ingeniería Forestal y del Medio Natural

ANEJO IV: DISEÑO DE LA LÍNEA PRODUCTIVA

- **Capacidad:** Debe ser capaz de procesar el volumen máximo de solución a liofilizar que se considera en este proyecto. Con las proyecciones iniciales este volumen es el de *T. harzianum*, que asciende a 55,69 litros de solución.
- **Temperatura:** Debe ser capaz de alcanzar las temperaturas mínimas y máximas establecidas en el protocolo de liofilización para cada especie. Las temperaturas mínimas y máximas requeridas corresponden a *Pseudomonas*, con -40 °C y 30 °C.
- **Presión:** La presión mínima requerida durante el primer y segundo secado es de 0,2 mbar, por lo que el modelo elegido debe proporcionar estos valores mínimos de presión.
- **Velocidad de enfriamiento:** La velocidad de congelación es un factor esencial en el proceso de liofilización, ya que la calidad final del producto depende de ella. De esta forma el modelo elegido debe ser capaz de alcanzar velocidades de enfriamiento de hasta -1,50 °C/min en el caso de *Trichoderma spp.*

Para la elección del modelo a utilizar se han seguido todos los criterios anteriores, a los que se ha añadido que la máquina en cuestión debe ser adecuada para trabajar con microorganismos. Tras la comparación y análisis de diversos modelos, se ha elegido el modelo de liofilizador por contacto FD-50, producido por la firma Kemolo y cuyas características se muestran en la Tabla 23.

3.1.3.1 Capacidad

El modelo FD-50 dispone de una cámara de vacío en la que se encuentran seis estantes sobre los que se colocan las bandejas con el producto a liofilizar. El modelo de bandejas a utilizar es el Teclen® Lyoprotect® LPMU-V2740B-WS; especialmente diseñadas para evitar la pérdida de producto durante la aplicación del vacío y que tienen una capacidad de trabajo de hasta 1,8 litros cada una. Se componen de componentes reutilizables, como un cuadro de acero inoxidable y juntas de sellado, además de por membranas de un solo uso.

Tabla 23: Dimensiones de la cámara, estantes y bandejas.

Cámara de vacío (m)	2,600 (L) x 1,100 (D)
Estantes (m)	1,300 (L) x 0,700 (An)
Bandejas (m)	0,270 (L) x 0,158 (An) x 0,043 (Pr)

El volumen máximo de solución que este modelo de liofilizadora puede procesar se calcula a partir de sus dimensiones, que se muestran en la Tabla 23. De esta forma el número de bandejas que se pueden colocar por cada estante asciende a 6, lo que hace un total de 36 bandejas totales y un volumen total de 64,8 litros de solución, lo que es más que suficiente para la producción inicial del proyecto. Sin embargo, el factor limitante es la capacidad de hielo a almacenar por el condensador, que es de 50 kg, suficiente para el propósito del proyecto.

Alumno: Rodrigo Herrera Sanz
 UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (CAMPUS DE PALENCIA). E.T.S. de Ingenierías Agrarias
 Titulación: Grado en Ingeniería Forestal y del Medio Natural

3.1.3.2 Temperatura

El modelo elegido realiza una congelación in situ, utilizando el refrigerante R404a, que enfría el aire en el interior de la cámara de vacío. Con este equipo la temperatura mínima que el liofilizador puede alcanzar es de $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ en el condensador, lo que significa que, por transmisión de temperatura, el producto puede alcanzar los $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$. Esta temperatura es suficientemente baja para completar el proceso de secado cubriendo las necesidades del proyecto.

3.1.3.3 Presión

El control de la presión se realiza a través de la bomba de vacío, que expulsa el aire del interior de la cámara reduciendo la presión hasta valores mínimos de $0,1\text{ mbar}$. Esta presión es suficientemente baja como para completar el protocolo de liofilización diseñado en apartados anteriores.

3.1.3.4 Velocidad de enfriamiento

Para usos estándar la velocidad de enfriamiento del modelo utilizado asciende a $0,36\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, lo que resultaría insuficiente para el presente proyecto, pero este parámetro puede ser modificado, hasta valores de $2,00\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ dependiendo del material con el que se trabaje. De esta forma el modelo FD-50 cumple con los requerimientos concernientes a la velocidad de congelación.

3.1.3.5 Otras características

Otras características del modelo elegido a tener en cuenta son las que se muestran en la Tabla 24.

Tabla 24: Características adicionales del modelo FD-50.

Potencia (kW)	10
Tensión (V)	110 - 220
Sistema de control	PLC (programmable logic control) con HMI, manual y automático
Área de instalación (m²)	9
Peso (kg)	2000
Tipo	Enfriamiento por conducción

Tras el análisis de las características, capacidades y servicios suministrados por el modelo en cuestión, se ha llegado a la conclusión de que este cumple con los requerimientos de la tercera y última fase del ciclo productivo, asegurando que la formulación se complete satisfactoriamente.

Tras la formulación del producto se procederá a su empaquetado. Este proceso se realizará manualmente transfiriéndolo desde las bandejas en las que ha sido liofilizado hasta su embalaje, en el que será conservado hasta su aplicación.

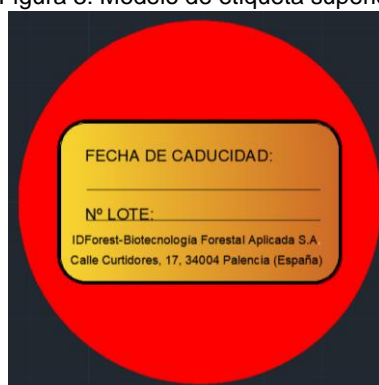
ANEJO IV: DISEÑO DE LA LÍNEA PRODUCTIVA

El embalaje elegido consiste en frascos de polipropileno estériles de 150 ml de capacidad y de dimensiones 7,43 cm de altura y 6,21 cm de diámetro mayor y 4,83 cm de diámetro menor. En cada frasco se añadirán 100 gramos de producto y, posteriormente se etiquetarán y conservarán en condiciones controladas de humedad (20 %) y temperatura (4 °C).

El etiquetado se realizará a mano, mediante etiquetas adhesivas en las que se incluirá la información establecida por el Real Decreto 506/2013 y su modificación en el Real Decreto 999/2017. Esta se compone de dos partes:

-Etiqueta superior: Situada sobre la tapa. En ella se incluye la información relativa a la fecha de caducidad, el lote y el nombre y dirección del productor. EL diseño de esta etiqueta se muestra en la Figura 3.

Figura 3: Modelo de etiqueta superior



-Etiqueta principal: Situada alrededor del frasco. Incluye la información relativa al tipo de organismo, sus características, sus funciones en el suelo y la planta, incompatibilidades, sistema de obtención, métodos de conservación y aplicación y advertencias de seguridad. Los diseños de estas etiquetas para *T. harzianum* y *T. atroviride* se muestran en la Figura 4 y Figura 5.

Figura 4: Modelo de etiqueta principal para *T. harzianum*



Figura 5: Modelo de etiqueta principal para *T. atroviride*



3.2 DEFINICIÓN DE LA LÍNEA DE PRODUCCIÓN: *PSEUDOMONAS* spp.

3.2.1 Línea de producción *Pseudomonas* spp: Fase I

La primera fase del ciclo productivo de *P. fluorescens* y *P. putida*, centrada en la producción del inóculo inicial, debe ser desarrollada en las condiciones de temperatura, pH, agitación y niveles de oxígeno adecuadas para optimizar el proceso. Ello hace que el control preciso de estos factores resulte crucial para el éxito del proceso productivo y que, por tanto, la utilización de maquinaria especializada resulte necesaria.

De esta forma se ha tomado la determinación de adquirir y utilizar un biorreactor con el que se pueda optimizar esta primera fase del proceso productivo. Las necesidades que este debe cubrir son las descritas en los apartados anteriores de este mismo anejo, sobre las condiciones en las que se debe llevar a cabo, además de la cantidad de inóculo a producir en esta fase. Estas necesidades se resumen a continuación:

- Temperatura: La temperatura a la que se debe completar esta fase del ciclo productivo, se ha establecido en 27 °C para *P. fluorescens* y 30 °C para *P. putida*.
- Acidez: El crecimiento y desarrollo de los primeros inóculos de *P. fluorescens* y *P. putida* debe realizarse con unos valores de pH de 6,3 y 7,0 respectivamente, por lo que el modelo de biorreactor a utilizar debe incluir un sistema de control del pH con el que se asegure su control.
- Agitación: La agitación establecida como óptima para el desarrollo de ambas especies de bacteria es de 150 rpm.
- Oxigenación: El oxígeno disuelto en el medio de cultivo es el mismo para ambas especies y se ha establecido en un 20%.
- Capacidad: Teniendo en cuenta la capacidad de desarrollo de cada especie se ha calculado la cantidad de inóculo líquido a producir en esta primera fase. Los valores obtenidos fueron de 0,97 l para *P. fluorescens* y 0,53 l para *P. putida*.

ANEJO IV: DISEÑO DE LA LÍNEA PRODUCTIVA

Teniendo en cuenta todos los requerimientos que el modelo a utilizar debe cumplir, además de analizar sus características y capacidades, se ha decidido considerar el modelo biorreactor/biofermentador F1 MB-3, de 3 litros de capacidad, producido por la firma Bionet. Este modelo es el mismo que el elegido para la misma fase en la línea de producción de *Trichoderma spp.* por lo que sus características y prestaciones son las mismas que se muestran en los apartados 3.1.1.1 al 3.1.1.6 y en la Tabla 20.

Tras el análisis tanto de las necesidades en esta fase, como de las prestaciones y características del dispositivo considerado, se llega a la conclusión de que este cumple con los requerimientos establecidos, por lo que será el elegido en este punto del proceso de producción.

3.2.2 Línea de producción *Pseudomonas spp.*: Fase II

Para la segunda fase del proceso productivo de *Pseudomonas spp.*, centrada en la multiplicación en masa de las unidades formadoras de colonias, también se requiere un control estricto de las condiciones de crecimiento para su optimización. Los factores de mayor influencia en esta fase son los mismos considerados en la fase anterior, dado que proceso que se lleva a cabo es muy similar y sus valores óptimos también coinciden con los elegidos anteriormente, mostrados en la Tabla 10 de este mismo anejo.

El único factor a tener en cuenta que varía con respecto a la primera fase del ciclo es la cantidad de solución que se tiene que producir. Esta ya ha sido calculada anteriormente, resultando ser de 26,67 l para *P. fluorescens* y de 14,45 l para *P. putida*. Como en la fase anterior, se requiere de un biofermentador para completar este proceso satisfactoriamente, por lo que el modelo a utilizar debe ser capaz de producir el volumen suficiente de solución en las condiciones óptimas.

Siguiendo este planteamiento, el biorreactor considerado para esta parte del ciclo es el modelo F2 MB-30, de 30 litros de capacidad, producido por la empresa Bionet. Este presenta unas características y configuración muy similares a las del modelo F3 MB-100, utilizado en la misma fase para *Trichoderma spp.*, salvo por el número de puertos y por tener una capacidad menor.

3.2.2.1 Tamaño y capacidad

En cuanto a su capacidad, el volumen total del biofermentador asciende a 44 l, con una capacidad de trabajo del 70 %, de forma que el volumen máximo de trabajo del biorreactor es de 30 l, mientras que el volumen mínimo al que puede trabajar es de 12 l.

3.2.2.2 Control de la temperatura

La temperatura es controlada gracias a un sensor con un rango de temperaturas que abarca desde los 5 °C hasta los 130 °C y con una precisión de $\pm 0,01$ °C. En caso necesario, la temperatura se modifica a través de un sistema de recirculación que lleva a cabo la modificación de la temperatura mediante el bombeo de agua fría o vapor según la necesidad.

3.2.2.3 Control del pH

El control del pH se lleva a cabo en tiempo real, gracias a un sensor insertado en la parte inferior del tanque, que determina el valor del pH, entre 0 y 14, con una precisión de $\pm 0,01$. En caso necesario, el pH se puede ajustar mediante el bombeo de ácidos (HCL) o bases (NaOH, KOH) hasta alcanzar el valor óptimo.

3.2.2.4 Control de la oxigenación

De la misma forma, el biofermentador dispone de un sensor de oxígeno disuelto (dO_2) que indica el nivel de oxígeno disuelto en el medio de cultivo, en un rango de 0 % al 100 % y con una precisión del $\pm 0,01$ %. Este valor se modifica mediante el bombeo de aire al interior del tanque.

3.2.2.5 Agitación

La agitación del medio de cultivo se realiza gracias a un agitador colocado en la parte superior del tanque y conectado a un puerto de 4,21 cm de diámetro. Está equipado con un servomotor con un rango de trabajo de entre 150-1200 rpm y una potencia de 1,1 kW. Este transmite el movimiento al medio gracias a tres turbinas Rushton equipadas con 6 palas cada una.

3.2.2.6 Otras características

Además de lo mencionado anteriormente, es importante resaltar otras características y elementos que el modelo considerado incorpora. Estas se muestran en la Tabla 25.

Tabla 25: Características adicionales del modelo F2 MB-30.

Instrumentación y control	
Software	R.O.S.A.+
FCU	Integrado en la estructura
Comunicación	2 puertos Ethernet (LAN y VPN) 1 puerto USB para descarga de datos 2 entradas analógicas externas configurables 1 salida analógica externa configurable 1 RS485 para comunicación con elementos externos
Automatización	Industrial PLC (Siemens) + Módulos E/S. Panel PC táctil 12" SVGA 800 x 600
Puertos	
Número total de puertos	20
Puertos Ø 7,30 cm	Boca de inspección con mirilla
Puertos Ø 5,50 cm	Introducción de aire/vapor
Puertos Ø 5,40 cm	Introducción de aire/vapor vía sparger
Puertos Ø 4,21 cm	Agitador
Puertos Ø 3,81 cm	2 puertos repuesto Condensador de gases
Puertos Ø 3,17 cm	Control del pH

Alumno: Rodrigo Herrera Sanz
UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (CAMPUS DE PALENCIA). E.T.S. de Ingenierías Agrarias
Titulación: Grado en Ingeniería Forestal y del Medio Natural

ANEJO IV: DISEÑO DE LA LÍNEA PRODUCTIVA

	Control de la oxigenación Puerto de repuesto
Puertos Ø 2,54 cm	Manómetro
Puertos Ø 1,27 cm	Control de temperatura Puerto de muestreo
Otros puertos	Válvula de recogida tipo diafragma Cristal vertical graduado 5 puestos de adición y pruebas
Dimensiones	
Altura tanque (cm)	80,1
Diámetro externo tanque (cm)	27,3
Dimensiones totales (cm)	110 (An) x 196,2 (Al) x 70 (F)
Materiales	
Material del tanque	Acero inoxidable A316L con fondo Kloppler y cristal borosilicato
Material de la FCU	Acero inoxidable A304 acabado mate
Material de la estructura	Acero inoxidable A304
Otras características	
Número de bombas	4 bombas peristálticas con velocidades de hasta 220 rpm y caudal de 190 ml/min
Esterilización	Sistema de esterilización automático
Servicios	
Inspección previa a la entrega (Tests IC/OC)	
Embalaje a cuenta de Bionet	
Entrega y transporte por Bionet o empresas colaboradoras	
Montaje incluido en las instalaciones del cliente	
Curso de utilización en las instalaciones de Bionet (adicional)	

Tras el análisis de las características y prestaciones del biofermentador considerado, se llega a la conclusión de que el modelo F2 MB-30 cumple con las necesidades de esta fase del ciclo productivo, por lo que será el utilizado para este propósito.

3.2.3 Línea de producción *Pseudomonas spp*: Fase III

Finalmente, la tercera y última fase del ciclo productivo de *Pseudomonas spp*. se centra en la formulación y conservación de las unidades formadoras de colonia, producidas en las fases anteriores. Para ello, en el diseño del protocolo se ha considerado llevar a cabo su liofilización, con el objetivo de conservar el producto y su viabilidad durante largos periodos de tiempo. Este tratamiento específico, solo se puede llevar a cabo mediante el uso de maquinaria especializada de gran complejidad y precio. Por ello, tal y como se ha indicado anteriormente, para este propósito se va a utilizar el mismo liofilizador utilizado en la línea de producción de *Trichoderma spp*, ya que también cumple con las necesidades que se presentan en el caso de *Pseudomonas spp*. y no se interrumpe ninguno de los procesos productivos.

Una vez llevada a cabo la formulación, se procederá al empaquetado, en lotes de 100 gramos de producto en frascos de polipropileno estériles de 150 ml de capacidad y de dimensiones 7,43 cm de altura, 6,21 cm de diámetro mayor y 4,83 cm de diámetro

Alumno: Rodrigo Herrera Sanz
UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (CAMPUS DE PALENCIA). E.T.S. de Ingenierías Agrarias
Titulación: Grado en Ingeniería Forestal y del Medio Natural

ANEJO IV: DISEÑO DE LA LÍNEA PRODUCTIVA

menor, posteriormente, etiquetado y conservado a 4 °C y niveles de humedad por debajo del 20 %.

El etiquetado de *Pseudomonas spp.*, regido por el Real Decreto 506/2013 y su modificación en el Real Decreto 999/2017, presenta las mismas partes e incluye la misma información que el utilizado para *Trichoderma spp.*, de esta forma la etiqueta superior es la que se muestra en la Figura 3, mientras que las etiquetas principales son las que se muestran en la Figura 6 y la Figura 7.

Figura 6: Modelo de etiqueta principal para *P. fluorescens*.



Figura 7: Modelo de etiqueta principal para *P. putida*.



4. OTRAS CONSIDERACIONES

Para completar el ciclo productivo satisfactoriamente es necesario tener en cuenta ciertos factores que afectan a la propia viabilidad del proyecto.

4.1 OTROS MATERIALES

Además de los definidos para cada una de las fases del ciclo productivo, se va a necesitar maquinaria y materiales adicionales para poder completar la producción.

- Fase I: Con respecto a la primera fase del ciclo productivo será necesaria la adquisición de dos fregaderos de 50,78 litros de volumen mínimo, en los que se producirán los medios de cultivo a utilizar durante la producción del inóculo y la multiplicación en masa. Así mismo será necesario adquirir garrafas

Alumno: Rodrigo Herrera Sanz
UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (CAMPUS DE PALENCIA). E.T.S. de Ingenierías Agrarias
Titulación: Grado en Ingeniería Forestal y del Medio Natural

ANEJO IV: DISEÑO DE LA LÍNEA PRODUCTIVA

autoclavables en las que se puedan esterilizar estos medios de cultivo y garrafas esterilizables en las que se pueda almacenar.

- Fase II: Debido a que en esta fase el medio de cultivo se complementa con un crioprotector, es necesario disponer de material para la elaboración de esta disolución. Esto significa que las cubas y garrafas mencionadas anteriormente también serán utilizadas para esta función.
- Fase III: Tras la liofilización y obtención del producto final, es necesario mantenerlo en condiciones controladas de humedad y temperatura. Para ello se considera necesario la utilización de una cámara frigorífica que permitirá la conservación del producto final y de otros reactivos, como los crio-protectores y los medios de cultivo.

También será necesaria la adquisición de cinco contenedores para la acumulación selectiva y gestión de residuos. En ellos se verterán plásticos, cristales, papel-cartón, materia orgánica y metales, de forma que se pueda llevar a cabo el correcto reciclado de los distintos tipos de residuos. Estos contenedores serán de uso general, utilizándose desde la entrega de los equipos, hasta en el proceso productivo. Además, se habilitará una zona a modo de vestuarios en la que los trabajadores puedan prepararse para el trabajo y guardar su ropa y equipos. Para ello, se necesita adquirir cuatro taquillas individuales, un banco y una caseta modular.

4.2 CONSIDERACIONES LEGALES

En virtud del Real Decreto 506/2013, de 28 de junio, sobre productos fertilizantes y su modificación de 6 de diciembre de 2017; por el cual se establecen las normas y requisitos a cumplir en las actividades de producción y comercialización de numerosos tipos de fertilizantes, se encuadran los considerados en el presente proyecto como "Productos especiales. Microorganismos no micorrícicos". Por ello, se van a realizar las siguientes acciones:

- Se realizará la inscripción de los productos a producir en el registro de productos fertilizantes de la Dirección General de Producciones y Mercados Agrarios, perteneciente al Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. La solicitud será presentada conforme lo establecido en su artículo 24.
- Se llevará a cabo el seguimiento de la calidad del producto para verificar que su riqueza se mantiene en los niveles anunciados por el productor y siempre por encima del mínimo establecido por la ley. De esta forma, trimestralmente se tomarán muestras del producto final, el cual será analizado en laboratorio.

ANEJO V: DESCRIPCIÓN DE LA NAVE DE PRODUCCIÓN

Índice del Anejo V

1. LOCALIZACIÓN Y SITUACIÓN	1
2. CARACTERÍSTICAS DE LAS INSTALACIONES	2
3. USOS PREVIOS	3
4. DISPOSICIÓN DE LA LÍNEA DE PRODUCCIÓN	3

1. LOCALIZACIÓN Y SITUACIÓN

El proyecto se llevará a cabo en el municipio de Palencia, capital de la provincia homónima. Esta se encuentra en la mitad norte de la comunidad autónoma de Castilla y León (España), compartiendo fronteras con las provincias de Valladolid, León, Burgos y la comunidad autónoma de Cantabria, al sur, oeste, este y norte respectivamente, tal y como se muestra en la Figura 1.



Figura 1: Localización de la provincia de Palencia (Fuente: Internet imágenes)

Por su parte el municipio de Palencia se localiza en el extremo sur de la provincia homónima, constituyendo, junto con los municipios circundantes, el principal centro de población y actividad económica de la provincia. Ello junto con su cercanía a Valladolid (50 km), capital de la región, hace que tenga una buena comunicación con el centro y norte peninsular.

Con respecto a las comunicaciones terrestres destacan las autovías A-62 y A-67 que conectan la ciudad con otras capitales de provincia (Salamanca, Valladolid y Burgos) y con la comunidad autónoma de Cantabria respectivamente. También destacan las infraestructuras ferroviarias, que conectan la ciudad con Valladolid, Segovia y Madrid. En cuanto a las comunicaciones aéreas, se restringen al aeropuerto de Villanueva (Valladolid), situado a 54 kilómetros de la ciudad de Palencia.

Como muestra la Figura 2, el proyecto se sitúa en el cuadrante sur-este del municipio de Palencia, en el Polígono Industrial San Antolín, con dirección en la Calle Curtidores número 17, en las instalaciones pertenecientes a la empresa promotora.



Figura 2: Situación del proyecto. (Elaboración propia)

2. CARACTERÍSTICAS DE LAS INSTALACIONES

La zona en cuestión goza de buenas comunicaciones con el resto del municipio, basadas en carreteras amplias y asfaltadas, adecuadas para la circulación de vehículos de gran tonelaje, como trailers y camiones, si bien es cierto que el terreno presenta una ligera pendiente (10 %) que puede dificultar tareas de carga y descarga. Además, y debido a su situación en una zona industrial, existen líneas eléctricas y de agua, que garantizan el suministro y el correcto funcionamiento de equipos y maquinaria industrial.

Las instalaciones fueron construidas en el año 2009 y se componen de una única nave de vocación industrial de 460 m² de superficie construida, utilizable en el presente proyecto, de una explanada frontal en pendiente de 103 m² y una explanada trasera de 37 m², sumando 600 m² de superficie total. Presenta una planta rectangular de orientación noreste-suroeste de 15,00 m de ancho y 30,62 m de largo y una altura de 10 metros. Dispone de un portón de entrada basculante de 5,30 metros de alto y 4,90 metros de ancho con una puerta de menor tamaño (2 m alto) que permite la entrada y salida de la nave sin necesidad de abrir el portón en su totalidad. Estas y otras características se recogen en la Tabla 1.

Tabla 1: Características de las instalaciones a utilizar.

Coordenadas (UTM: 30N ETRS89)		X: 375.464,37 Y: 4.650.926,65
Ref. Catastral		5413612UM7551S0001TE
Superficie (m²)	Total	600
	Construida	460
Dimensiones construcción (m)	Ancho	15,00
	Largo	30,62
	Alto	10,00
Dimensiones portón (m)	Ancho	4,90
	Alto	5,30

3. USOS PREVIOS

Las instalaciones en las que se instalarán los equipos y se llevará a cabo el presente proyecto han sido utilizadas previamente con diferentes fines. Principalmente las instalaciones en cuestión se han utilizado como área auxiliar a los trabajos y proyectos llevados a cabo en los laboratorios de la empresa promotora y que, por la falta de espacio o por la naturaleza del trabajo, no se podían completar en otro lugar. Adicionalmente, se utiliza para el almacenamiento de materiales y equipos.

4. DISPOSICIÓN DE LA LÍNEA DE PRODUCCIÓN

Aparte de las características de los organismos, el protocolo de producción y los equipos a utilizar, otro de los factores que influirán en la calidad final del producto y en la viabilidad del proyecto, es la organización de las instalaciones en las que este se va a llevar a cabo. De esta forma, la distribución de los espacios y la disposición de los equipos adquieren una gran importancia. La distribución y disposición final de los espacios y equipos se explica en profundidad en el Documento II. PLANOS. Para su determinación se han tenido en cuenta los siguientes criterios, ordenados de mayor a menor importancia:

-Calidad: Considerado el criterio prioritario. La distribución de la nave y la disposición de los equipos se han establecido de tal forma que se minimice al máximo la posibilidad de contaminación del producto.

-Aprovechamiento del espacio: Se ha intentado distribuir los equipos y elementos que conforman las líneas de producción de forma uniforme, evitando los espacios vacíos (sin propósito determinado) y la concentración de los equipos en pequeños espacios.

-Funcionalidad: Tras analizar las labores a completar en el proceso productivo, se han intentado agrupar aquellos elementos y equipos que intervienen en una misma parte del ciclo, siempre recordando que hay equipos de uso común en las distintas fases del ciclo. Con ello se busca disminuir, en la medida de lo posible, el tiempo requerido para completar las tareas a realizar durante el ciclo productivo.

Siguiendo los criterios explicados anteriormente, la distribución de las instalaciones será la que se muestra en la Figura 4.

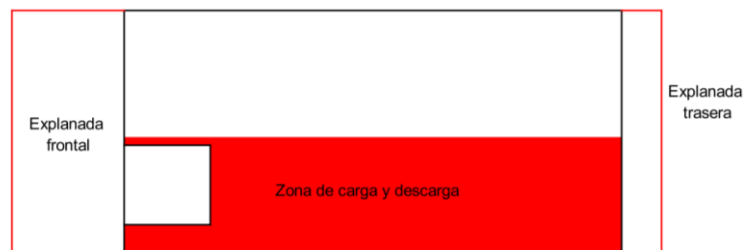


Figura 4: Distribución de las instalaciones

Dentro de la zona construida se han definido dos zonas diferenciadas por su función. La zona representada en color rojo se destinará a funciones de carga y descarga, tanto en

ANEJO V: DESCRIPCIÓN DE LA NAVE DE PRODUCCIÓN

la recepción de materiales, como en el envío del producto final. Esta zona tiene unas dimensiones de 30,62 m de largo y 7,20 m de ancho, con una superficie total de 220,46 m². La zona representada en blanco, con unas dimensiones de 30,62 m de largo y 7,80 m de ancho, tiene una superficie total de 238,84 m². Será en la que se instalen los equipos que componen las líneas de producción, pero también los contenedores de reciclaje y los vestuarios de los trabajadores.

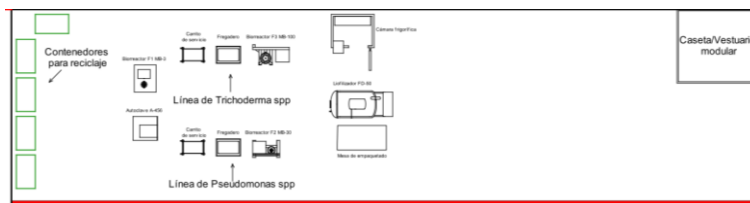


Figura 5: Disposición de los equipos

En la Figura 5, se puede observar la disposición de los equipos que componen la línea de producción, además de los contenedores de reciclaje y los vestuarios de los trabajadores. Analizando esta imagen de izquierda a derecha, los contenedores de reciclaje se sitúan, dentro de la zona de equipos, lo más cerca posible de la salida, con el fin de facilitar las labores de eliminación de desechos y residuos, disminuyendo la distancia con el punto de recogida de basuras. Por su parte la línea de producción se sitúa tras los contenedores, a una cierta distancia (3,83 m) de estos, de forma que se eviten contaminaciones al mismo tiempo que la zona de reciclaje es fácilmente accesible. En la medida de lo posible, los equipos comunes a ambas líneas se han posicionado equidistantes a los equipos específicos de cada especie, los cuales se encuentran enfrentados los unos a los otros. Finalmente, los vestuarios se encuentran en la esquina superior derecha de la imagen, al fondo de la nave, a una distancia considerable (11,70 m) de la línea de producción. Con ello se pretende reducir el riesgo de contaminación. En un futuro se espera utilizar el espacio vacío entre los vestuarios y la línea de producción como zona de almacenaje adicional o para ampliar la línea de producción, si se decidiera continuar con la actividad tras el final de la vida útil del proyecto.

ANEJO VI: PROGRAMACIÓN PARA LA EJECUCIÓN DEL PROYECTO

Índice del Anejo VI

1. INTRODUCCIÓN	1
2. INGENIERÍA DEL PROCESO PRODUCTIVO	1
2.1 CICLO PRODUCTIVO	1
2.2 COSTES DE PRDUCCIÓN	2
2.3 PRODUCTIVIDAD Y PUREZA	4
2.4 PROGRAMA DEL CICLO PRODUCTIVO	5
2.4.1 Criterios de planificación	5
2.4.2 Propuesta de programa	6
2.5 TRATAMIENTO Y APLICACIÓN	10
2.5.1 Tratamiento <i>Trichoderma spp.</i>	10
2.5.2 Tratamiento <i>Pseudomonas spp.</i>	11
2.5.3 Modo de aplicación	12
2.6 PRECIO	13
3. PROGRAMACIÓN DE LA ACTIVIDAD	14
3.1 TRÁMITES ADMINISTRATIVOS	14
3.2 CONFORMACIÓN DE LA LÍNEA DE PRODUCCIÓN	15
3.3 CRONOGRAMA DE LA ACTIVIDAD	16

ANEJO VI: PROGRAMACIÓN PARA LA EJECUCIÓN DEL PROYECTO

1. INTRODUCCIÓN

El presente proyecto centrado en el diseño de la línea de producción y del ciclo productivo de *Trichoderma spp.* y *Pseudomonas spp.* se estructura tal y como se explica en el anejo IV. Se compone de dos líneas de producción paralelas, que presentan las mismas etapas y estructura; sin embargo, funcionan de forma independiente. La decisión de diseñar dos líneas diferentes se debe a las notables diferencias y necesidades de cada tipo de organismo, mientras que, al mismo tiempo, esta organización permite la utilización de los mismos recursos en fases específicas del ciclo, reduciendo el coste total del proyecto.

Tanto el diseño de la línea, como el proceso productivo se han diseñado para alcanzar el máximo rendimiento de la producción, lo que permite cumplir con los requerimientos legales y con la demanda, cada vez mayor, del mercado. Se ha realizado a partir de las referencias bibliográficas consultadas y de las experiencias y test a pequeña escala, llevados a cabo en laboratorio, que además han permitido optimizar el proceso productivo. Esto hace que las producciones previstas y calculadas anteriormente sean suficientemente cercanas a las que se obtendrán tras la consecución del ciclo productivo, siendo esta la única fuente de ingresos del proyecto.

2. INGENIERÍA DEL PROCESO PRODUCTIVO

2.1 CICLO PRODUCTIVO

El ciclo productivo se compone de tres fases, comunes para ambas líneas, diferenciadas entre sí por sus objetivos, naturaleza, los materiales y la maquinaria a utilizar. Estas fases se encuentran resumidas en la Tabla 1 y la Tabla 2:

Tabla 1: Resumen del ciclo productivo de *Trichoderma spp.*

Ciclo	Etapas	Objetivo	Procesos	Duración
Ciclo productivo de <i>Trichoderma spp.</i>	Fase I	El propósito principal de esta primera fase es la formación de un primer propágulo que actuará como precursor en las fases posteriores.	-Preparación de inóculos. -Preparación del medio de cultivo. -Esterilización del medio de cultivo. -Incubación.	4 días
	Fase II	Esta segunda fase se centra en el desarrollo y evolución del propágulo precursor, formado en la primera fase, bajo condiciones óptimas para alcanzar la máxima producción posible.	-Adición de nuevo medio de cultivo. -Multiplicación en masa.	7 días

ANEJO VI: PROGRAMACIÓN PARA LA EJECUCIÓN DEL PROYECTO

	Fase III	En la última fase se busca formular el producto, de forma que sea manejable y, además, conservar su viabilidad durante largos periodos de tiempo.	-Liofilizado del producto. -Conservación.	1,02 días
--	----------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------	-----------

Tabla 2: Resumen del ciclo productivo de *Pseudomonas spp.*

Ciclo	Etapas	Objetivo	Procesos	Duración
Ciclo productivo de <i>Pseudomonas spp.</i>	Fase I	Esta primera fase se centra en la generación de la primera colonia de bacteria, precursora de las que se producirán posteriormente.	-Preparación de inóculos. -Preparación del medio de cultivo. -Esterilización del medio de cultivo. -Incubación.	32 horas
	Fase II	Se lleva a cabo la multiplicación en masa de la colonia inicial, aumentando el número de UFC.	-Adición de nuevo medio de cultivo. -Multiplicación en masa.	18 horas
	Fase III	Tras la multiplicación en masa, se procede a la formulación y conservación de las UFC generadas anteriormente, con el fin de preservar su viabilidad.	-Liofilizado del producto. -Conservación.	38,78 horas

2.2 COSTES DE PRODUCCIÓN

Los costes de producción se van a referir, en este caso, al coste de completar un ciclo productivo para cada especie objetivo. Estos costes incluyen los materiales utilizados, el coste horario de la maquinaria que compone la línea de producción y el coste de la mano de obra, calculado a partir de la Figura 1. Los costes de producción para cada especie se muestran en la Tabla 3, Tabla 4, Tabla 5 y Tabla 6, mientras que los costes de producción mensuales se muestran en la Tabla 7.

ANEJO VI: PROGRAMACIÓN PARA LA EJECUCIÓN DEL PROYECTO

Tabla 3: Coste de un ciclo de producción de *Trichoderma harzianum*.

Ciclo	Fase	Coste
Ciclo productivo de <i>Trichoderma harzianum</i>	Fase I	152,24
	Fase II	2110,91
	Fase III	191,91
Total		2455,06

Tabla 4: Coste de un ciclo de producción de *Trichoderma atroviride*.

Ciclo	Fase	Coste
Ciclo productivo de <i>Trichoderma atroviride</i>	Fase I	150,70
	Fase II	2110,79
	Fase III	191,50
Total		2452,99

Tabla 5: Coste de un ciclo de producción de *Pseudomonas fluorescens*.

Ciclo	Fase	Coste
Ciclo productivo de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Fase I	109,44
	Fase II	142,84
	Fase III	204,76
Total		457,04

Tabla 6: Coste de un ciclo de producción de *Pseudomonas putida*.

Ciclo	Fase	Coste
Ciclo productivo de <i>Pseudomonas putida</i>	Fase I	85,22
	Fase II	140,97
	Fase III	204,56
Total		430,75

Tabla 7: Coste mensual del ciclo productivo

Ciclo	Nº Ciclos	Coste unitario (€/ciclo)	Coste total (€)
<i>T. harzianum</i>	1	2455,06	2455,06
<i>T. atroviride</i>	1	2452,99	2452,99
<i>P. fluorescens</i>	4	457,04	1818,86
<i>P. putida</i>	4	430,75	1713,70

Es importante recordar que tanto en *Trichoderma spp*, como en *Pseudomonas spp*. el coste del ciclo productivo cambia tras el primer ciclo, dado que en el segundo ciclo productivo y en adelante no es necesaria la producción del inóculo en estado sólido, al utilizar una pequeña parte del inóculo en estado líquido para reiniciar el proceso.

Los costes totales de producción mensual, se recogen en la Tabla 8.

ANEJO VI: PROGRAMACIÓN PARA LA EJECUCIÓN DEL PROYECTO

Tabla 8: Coste mensual de la producción

Coste del ciclo productivo (€/mes)	Coste mano de obra (€/mes)	Coste total mensual (€)
8440,61	20476,24	28916,85

2.3 PRODUCTIVIDAD Y PUREZA

En este caso la productividad se define como la cantidad de producto final que se obtiene por cada mes de producción. En el anejo IV, centrado en el diseño y cálculo de la línea de producción, se tomó como referencia la demanda mensual (ha/mes a tratar) de producto final, proyectada por el promotor. De esta forma se pudo calcular el tamaño de la maquinaria necesaria y el número de ciclos a completar para cada especie.

Para el cálculo de la productividad y los parámetros de calidad del producto final, es importante tener en cuenta que, tras la formulación se obtendrán 35 gramos de materia seca por cada litro de solución (Hongo + Medio + Crio-protector) y 19 gramos de agente activo por cada litro de solución de agente activo (Hongo + Medio) en el caso de *Trichoderma spp.* De la misma forma, en el caso de *Pseudomonas spp.* se obtendrán 10,20 gramos de materia seca por cada litro de solución (Bacteria + Medio + Crio-protector) y 5,3 gramos de agente activo por cada litro de solución de agente activo (Bacteria + Medio). La productividad del ciclo productivo es la que se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9: Productividad por ciclo de cada especie.

Especie	V. líquido total (l)	V. líquido agente activo (l)	Masa materia seca (g)	Masa agente activo (g)
<i>T. harzianum</i>	55,69	50,63	1949,15	961,97
<i>T. atroviride</i>	50,58	45,98	1770,30	873,62
<i>P. fluorescens</i>	26,67	23,81	272,03	126,19
<i>P. putida</i>	14,45	12,90	147,39	68,37

Para el cálculo de la producción mensual se necesitan los datos de productividad de cada ciclo de producción y el número de ciclos productivos que se completan cada mes para cada especie. Estos datos de productividad mensual se muestran en la Tabla 10:

Tabla 10: Productividad mensual.

Especie	Nº Ciclos	Producción total mensual (g)	Producción mensual agente activo (g)
<i>T. harzianum</i>	1	1949,15	961,97
<i>T. atroviride</i>	1	1770,30	873,62
<i>P. fluorescens</i>	4	1088,12	504,76
<i>P. putida</i>	4	589,56	273,48

ANEJO VI: PROGRAMACIÓN PARA LA EJECUCIÓN DEL PROYECTO

Uno de los parámetros exigidos por la legislación es la declaración de la pureza del producto, la cual debe indicarse en el etiquetado. Esta se ha calculado como la relación de la masa de los agentes activos y la masa total de producto al final del ciclo productivo, dando lugar a los resultados que se muestran en la Tabla 11:

Tabla 11: Valores de pureza del producto final.

Especie	Masa materia seca (g)	Masa agente activo (g)	Pureza (%)
<i>T. harzianum</i>	1949,15	961,97	49,35
<i>T. atroviride</i>	1770,30	873,62	49,34
<i>P. fluorescens</i>	272,03	126,19	46,38
<i>P. putida</i>	147,39	68,37	46,39

2.4 PROGRAMA CICLO PRODUCTIVO

2.4.1 Criterios de planificación

El programa de producción o programa del ciclo productivo, es uno de los factores que determina la viabilidad del proyecto, debido a que de él depende la producción final y parte de los costes de producción. Por ello, se planificará un programa mensual para la consecución de los ciclos productivos (10 en total) que se necesitan completar mensualmente. Para su diseño y definición se van a tener en cuenta los siguientes criterios:

- **Calidad:** La calidad del producto final, junto a la seguridad, es la prioridad de forma que el resto de criterios utilizados en la definición del programa, se consideran de menor orden a este y se supeditan a él. De esta forma y para obtener la máxima calidad posible, los ciclos deben completarse tal y como se explican en el anejo IV, sin pausas ni alteraciones, respetando los tiempos de cada fase, las características y las necesidades de cada especie.
- **Seguridad:** Una de las prioridades en la planificación del programa de producción. Todas las tareas a realizar durante el ciclo productivo se deberán realizar de forma segura y siguiendo lo establecido en el anejo VIII.
- **Orden:** Relacionado con el criterio anterior, siempre se llevará a cabo el ciclo productivo de forma ordenada, asegurando la esterilidad de los sistemas y equipos utilizados antes y después de cada uso.
- **Rendimiento:** El ciclo productivo se planificará, en la medida de lo posible, con el fin de no mantener los equipos fuera de uso durante periodos de tiempo largos (10-15 días), intentando distribuir su uso de forma regular a lo largo del mes.
- **Descanso:** Teniendo en cuenta el bienestar de los trabajadores se intentará diseñar el programa de producción respetando los periodos de descanso de los trabajadores, evitando el trabajo durante los domingos y/o, en caso de no poder evitarlo, minimizar las horas trabajadas durante esos días

ANEJO VI: PROGRAMACIÓN PARA LA EJECUCIÓN DEL PROYECTO

2.4.2 Propuesta de programa

Siguiendo los criterios explicados en el punto anterior y teniendo siempre en cuenta los órdenes de prioridad y la duración de cada una de las fases y tareas del proceso productivo, recogidas en la Figura 1, se ha diseñado la propuesta de programa de producción mensual tipo, que cubre las necesidades del proyecto tanto en calidad como en cantidad a producir. En ella se muestran el número de ciclos que se completan por cada especie y la duración de cada fase del ciclo productivo, información mostrada en la Tabla 12, además de la duración de la jornada laboral.

Tabla 12: Propuesta de programa de producción mensual.

Especie	Fase	Duración (h)
<i>Trichoderma spp.</i>	I	48
	II	168
	III	24,65
<i>Pseudomonas spp.</i>	I	18
	II	18
	III	38,78

De la misma forma se ha elaborado un calendario de uso de los equipos, Figura 2, en el que se determina el momento en el que se utiliza cada elemento de la línea de producción y su duración, conforme a la Figura 1.

Para cumplir con los criterios de planificación, se han tomado las siguientes determinaciones:

-Tal y como se indica en el programa y en los criterios de planificación siempre, tras su uso, se esterilizarán los equipos utilizados. Los biorreactores F2 MB-30 y F3 MB-100 incorporan un sistema de esterilización propio a base de vapor, pero en el caso del modelo F1 MB-3 será necesario llevar a cabo su esterilización en el autoclave A-456. De la misma forma, el liofilizador FD-50 será esterilizado con una solución hidroalcohólica.

-Los medios de cultivo, NB y Agua de trigo, serán elaborados *in situ* y esterilizados en autoclave un par de horas antes de su uso, lo que garantizará que su temperatura no constituya ningún peligro tanto para los trabajadores, como para los microorganismos.

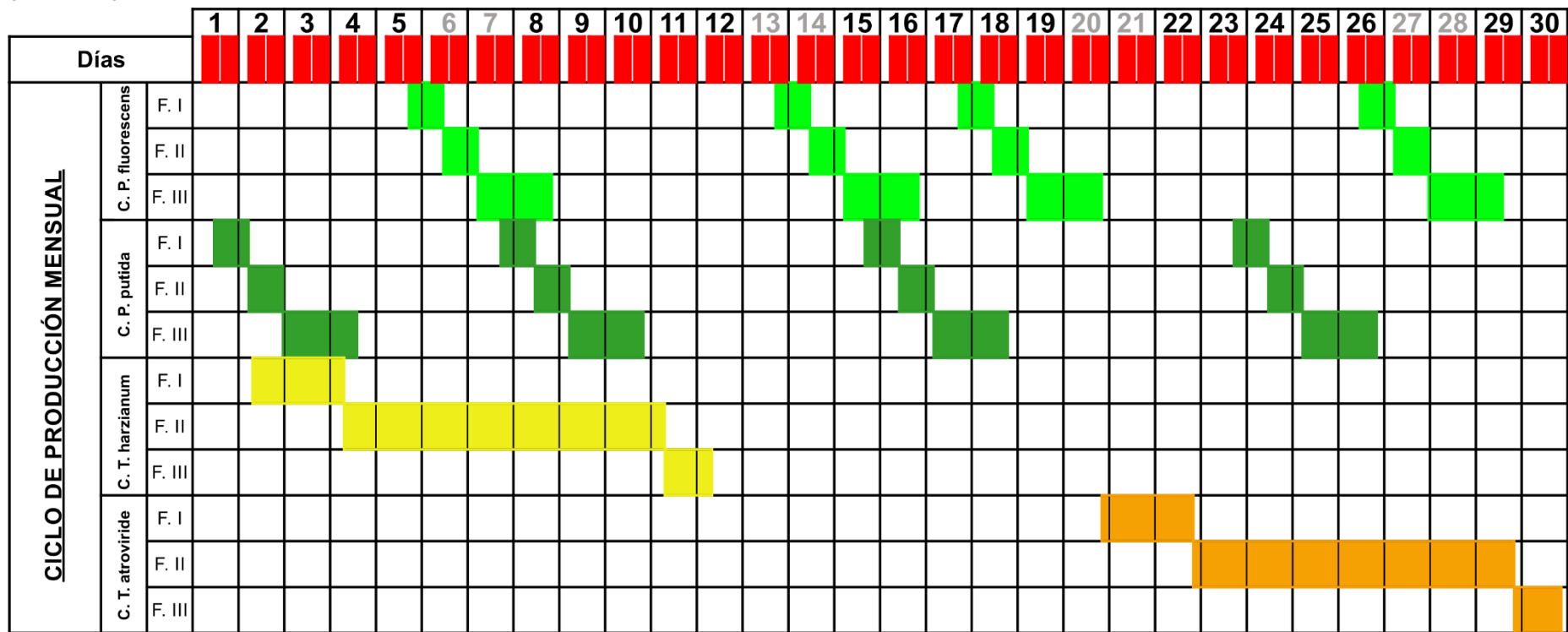
-Con respecto a las soluciones crio-protectoras; únicamente la disolución de maltodextrina 20 %, utilizada en la producción de *Trichoderma spp.* será elaborada *in situ* y, posteriormente, esterilizada en autoclave. Al igual que en el caso anterior, su esterilización se llevará a cabo al menos dos horas antes a su utilización, para garantizar que su temperatura se ajusta a la del medio de cultivo. Por su parte, la solución crio-protectora utilizada en la producción de *Pseudomonas spp.* será comprada ya esterilizada y preparada para su aplicación.

-Las jornadas de trabajo, conformadas por dos turnos de ocho horas cada uno, están diseñadas para ser llevadas a cabo por cuatro trabajadores. El primer turno se inicia a

ANEJO VI: PROGRAMACIÓN PARA LA EJECUCIÓN DEL PROYECTO

las 5:00 horas y finaliza a las 13:00 horas, mientras que el segundo comienza a las 15:00 horas y finaliza a las 23:00 horas. Debido a las necesidades del proceso productivo se deberá trabajar dos de los cuatro domingos del mes, los cuales serán considerados como días festivos.

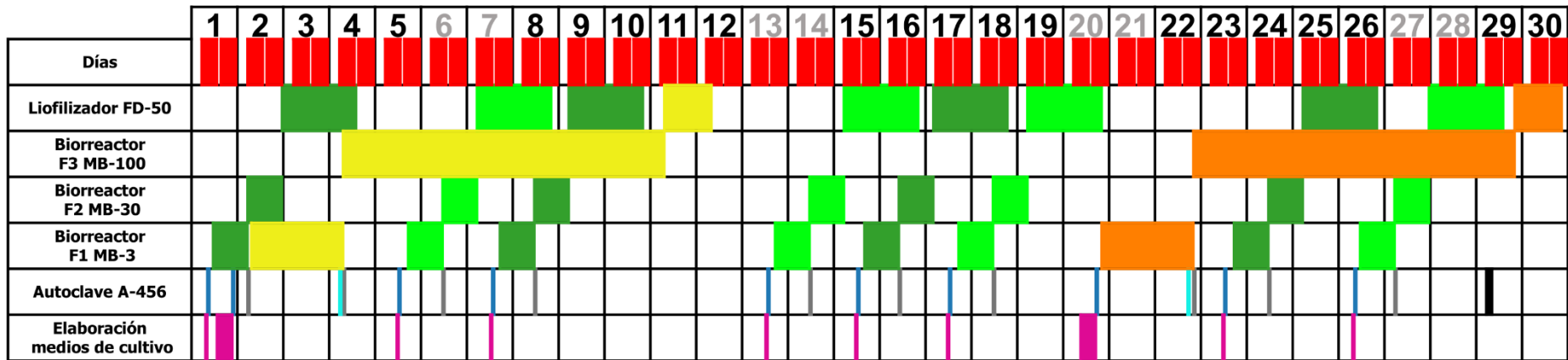
Figura 1: Programa de producción mensual tipo.



Leyenda

- Ciclo P. fluorescens
- Ciclo P. putida
- Ciclo T. harzianum
- Ciclo T. atroviride
- Jornadas de trabajo

Figura 2: Uso de la maquinaria y equipos.



Leyenda

- Ciclo *P. fluorescens*
- Ciclo *P. putida*
- Ciclo *T. harzianum*
- Ciclo *T. atroviride*
- Elaboración medios de cultivo
- Jornadas de trabajo
- Otras esterilizaciones
- Esterilización medios de cultivo
- Esterilización solución maltodextrina
- Esterilización Biorreactor F1 MB-3

2.5 TRATAMIENTO Y APLICACIÓN

La aplicación del producto en el suelo constituye uno de los factores esenciales para el éxito del tratamiento. Tanto el momento de su aplicación, como la dosis a utilizar son factores clave a tener en cuenta.

El diseño de los tratamientos con estos microorganismos se ha llevado a cabo utilizando como referencia la bibliografía consultada. Sin embargo, debido a lo novedoso de este tratamiento en el sector forestal, la cantidad de recursos bibliográficos sobre tratamientos en este campo es muy pobre, por ello, se han tomado como referencia los tratamientos llevados a cabo en el sector agrícola, modificándolos para ajustarlos a las necesidades y características del mundo forestal.

Con respecto a la dosis de los tratamientos la bibliografía consultada sugiere aplicar dosis que oscilan entre 10^{10} y 5×10^{10} propágulos por hectárea de suelo a tratar, para *Trichoderma spp.* y entre 5×10^8 y 8×10^8 para *Pseudomonas spp.* Estos tratamientos se llevan a cabo en cultivos agrícolas compuestos por plantas con pequeños sistemas radiculares, de poca profundidad y compuestos en su mayoría por raíces finas y pequeñas que, en conjunto presentan una gran superficie. En comparación en las masas forestales predominan sistemas radiculares de mayor envergadura y profundidad, pero que también presentan una alta cantidad de raíces de pequeño tamaño, aunque el número medio de pies por hectárea, comparado con la densidad de plantación de los cultivos agrícolas, es mucho menor.

2.5.1 Tratamiento *Trichoderma spp.*

Se considera necesario aplicar dosis de *Trichoderma spp.* ligeramente mayores a los aplicados en el sector agrícola, con el fin de asegurar el asentamiento y desarrollo del hongo en el suelo, tanto en profundidad, como en superficie. De esta forma se ha determinado que las dosis de este tratamiento oscilen entre 10^{11} y $1,44 \times 10^{11}$ propágulos por hectárea a tratar.

El momento de aplicación del tratamiento dependerá de las condiciones ambientales y de la especie con la que se trabaje. Para garantizar el establecimiento del hongo, este debe aplicarse en condiciones benignas para su desarrollo, determinándose la horquilla de temperaturas entre los 30 y los 12 °C como temperaturas máximas y mínimas respectivamente, por lo que estos valores serán los que se tendrán en cuenta para la programación del proyecto. De forma general se recomienda aplicar este tratamiento en coníferas durante el otoño, puesto que es en esta época del año en la que se produce el mayor desarrollo del sistema radicular. En el caso de las angiospermas, el desarrollo radicular se produce tras el fin del periodo vegetativo, durante la primavera principalmente, por lo que la aplicación de *Trichoderma spp.* en estas especies se recomienda en esta época. Sin embargo, a pesar de que el otoño y la primavera son las mejores épocas para la aplicación de *Trichoderma spp.*, estas se pueden aplicar en cualquier momento del año, sin verse afectada su efectividad, siempre y cuando se den las condiciones mínimas que permiten la supervivencia y el desarrollo de los hongos.

Siempre se buscará realizar el tratamiento sobre suelos húmedos y sin previsiones de lluvia en los días posteriores, para evitar el lavado y pérdida de los propágulos.

Alumno: Rodrigo Herrera Sanz

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (CAMPUS DE PALENCIA). E.T.S. de Ingenierías Agrarias

Titulación: Grado en Ingeniería Forestal y del Medio Natural

ANEJO VI: PROGRAMACIÓN PARA LA EJECUCIÓN DEL PROYECTO

Siguiendo estas indicaciones, se establece el calendario de tratamientos mostrado en la Tabla 13.

Tabla 13: Calendario de tratamientos tomado como referencia.

Especie	Periodo de aplicación		Dosis (propágulos/ha)
	Inicio	Final	
Coníferas	15 septiembre	15 noviembre	$1,44 \times 10^{11}$
Angiospermas	15 marzo	15 mayo	$1,44 \times 10^{11}$

Este calendario de tratamientos debe ser considerado como una guía, de forma que siempre deben considerarse las características y peculiaridades propias de la masa y el lugar en el que se pretenda aplicar el tratamiento.

2.5.2 Tratamiento *Pseudomonas spp.*

De la misma forma y por las razones expuestas anteriormente es recomendable la aplicación de dosis superiores a las aplicadas en el sector agrícola que, en este caso se encuentran entre 5×10^8 y 8×10^8 UFC por hectárea a tratar. Con el fin de establecer biofilms, desarrollados por las bacterias, en las partes más sensibles del sistema radicular, la dosis a utilizar será sensiblemente mayor, llegando a las 10^{10} UFC por hectárea.

Las condiciones de aplicación se asemejan a las de *Trichoderma spp.* Puede aplicarse a lo largo de todo el año, siempre evitando las condiciones extremas de temperatura (12-30 °C) y humedad y se debe adaptar el tratamiento al tipo de especie y al lugar en el que se trabaje. Sin embargo, al presentar un desarrollo mucho más rápido, en caso de necesidad, el tratamiento a base de *Pseudomonas spp.* puede llevarse a cabo en los límites del calendario de tratamiento, el cual se muestra en la Tabla 14.

Tabla 14: Calendario de tratamientos tomado como referencia.

Especie	Periodo de aplicación		Dosis (UFC/ha)
	Inicio	Final	
Coníferas	15 septiembre	15 noviembre	10^{10}
Angiospermas	15 marzo	15 mayo	10^{10}

Es importante tener en cuenta que, si se pretende combinar el tratamiento de *Trichoderma spp.* y de *Pseudomonas spp.*, el hongo deberá ser aplicado antes, con una diferencia de entre 3 y 4 días, debido a su capacidad y velocidad de desarrollo más lento.

ANEJO VI: PROGRAMACIÓN PARA LA EJECUCIÓN DEL PROYECTO

2.5.3 Modo de aplicación

Una vez determinado el tratamiento y las dosis a utilizar, se va a calcular la cantidad de producto necesario por hectárea y su modo de aplicación.

El cálculo de agente activo de *Trichodermas spp.* que se necesita por cada hectárea se realiza a partir de la dosis definida anteriormente y de la pureza y la cantidad de propágulos por cada gramo de agente activo. En el anejo IV se decidió producir $1,15 \times 10^{13}$ propágulos al mes, lo que hace que, el número de propágulos por cada gramo de agente activo se calcule de la siguiente forma:

$$P_g = N \times (Maa)^{-1}$$

Donde:

- P_g : Es la cantidad de propágulos por cada gramo de agente activo. (prop. / g)

-N: Son las necesidades mensuales, definidas en el anejo IV.

-Maa: Masa de agente activo producido por mes.

$$P_g = 1,15 \times 10^{13} \frac{\text{propágulos}}{\text{mes}} \times (961,97)^{-1} \frac{\text{gramos}}{\text{mes}} = 1,20 \times 10^{10} \text{ Prop. /g } T. \textit{ harzianum}$$

$$P_g = 1,15 \times 10^{13} \frac{\text{propágulos}}{\text{mes}} \times (873,62)^{-1} \frac{\text{gramos}}{\text{mes}} = 1,32 \times 10^{10} \text{ Prop. /g } T. \textit{ atroviride}$$

Seguidamente, se debe proceder al cálculo de la relación entre la dosis por hectárea (D) y la cantidad de propágulos por cada gramo de agente activo (P_g), para conocer los gramos de este que se necesitan (G_a).

$$G_a = D \times P_g^{-1}$$

$$G_a = (1,44 \times 10^{11}) \frac{\text{propágulos}}{\text{ha}} \times (1,20 \times 10^{-10}) \frac{\text{propágulos}}{\text{g}} = 12,04 \text{ g } T. \textit{ harzianum}$$

$$G_a = (1,44 \times 10^{11}) \frac{\text{propágulos}}{\text{ha}} \times (1,32 \times 10^{-10}) \frac{\text{propágulos}}{\text{g}} = 10,94 \text{ g } T. \textit{ atroviride}$$

De esta forma la cantidad necesaria de agente activo para tratar una hectárea de suelo asciende a 12,04 y 10,94 gramos para *T. harzianum* y *T. atroviride* respectivamente; considerando que el agente activo constituye tiene un valor de pureza (p), la cantidad de producto (G_T) necesario para tratar una hectárea de suelo es de:

$$G_T = G_a \times (p)^{-1}$$

$$G_T = 24,39 \text{ gramos } T. \textit{ harzianum}$$

$$G_T = 22,17 \text{ gramos } T. \textit{ atroviride}$$

Por lo tanto, por cada hectárea de suelo a tratar con *T. harzianum* y *T. atroviride*, se necesita aplicar 24,39 y 22,17 gramos de estos productos respectivamente.

ANEJO VI: PROGRAMACIÓN PARA LA EJECUCIÓN DEL PROYECTO

Las cantidades necesarias de *P.fluorescens* y *P. putida* se calculan de la misma forma, utilizando los valores de producción, dosis y pureza definidos para estas especies, dando lugar a los resultados de la Tabla 15.

Tabla 15: Cantidad de producto necesaria para el tratamiento de una hectárea.

Especie	Masa agente activo (g/ha)	Masa total (g/ha)
<i>T. harzianum</i>	12,04	24,39
<i>T. atroviride</i>	10,94	22,17
<i>P. fluorescens</i>	0,79	1,70
<i>P. putida</i>	0,11	0,23

Con respecto a su aplicación, para el tratamiento de una hectárea se recomienda disolver el producto en agua (2-5 litros), mezclándolo bien para asegurar la homogénea distribución y disolución del producto y, posteriormente proceder a su pulverización sobre la superficie a tratar. Para asegurar el establecimiento y desarrollo de los microorganismos es recomendable llevar a cabo una segunda aplicación 2-3 semanas tras el primer tratamiento.

2.6 PRECIO

Para la determinación del precio de venta de los productos finales se van a tener en cuenta los costes de producción de cada línea, los costes de la mano de obra y el margen de beneficio que se pretende obtener, tomando como unidad de referencia el mes de producción.

Los costes de producción se han calculado como la relación entre el coste de completar el ciclo productivo de un mes entre los gramos de producto que se obtienen. De la misma forma en el cálculo de los costes de la mano de obra se ha tenido en cuenta el tiempo requerido por cada línea de producción (*Pseudomonas spp.* requiere 1,23 veces el tiempo invertido en *Trichoderma spp.*), de forma que el coste de la mano de obra de *Trichoderma spp.* es un 18,7 % más bajo. En la Tabla 16 se muestran los costes de producción, de la mano de obra y los costes totales por cada gramo producido.

Tabla 16: Costes de producción mensual.

Especie	Coste producción (€)	Coste mano de obra (€)	Producción mensual (g)	Coste total (€/g)
<i>T. harzianum</i>	2455,06	4591,08	1949,15	3,62
<i>T. atroviride</i>	2452,99	4591,08	1770,30	3,98
<i>P. fluorescens</i>	1818,86	5647,03	1088,12	6,86
<i>P. putida</i>	1713,70	5647,03	589,56	12,48

ANEJO VI: PROGRAMACIÓN PARA LA EJECUCIÓN DEL PROYECTO

El margen de beneficio que se quiere obtener por cada gramo de producto final es del 20 %. Se ha elegido este valor porque se considera que permitirá la viabilidad económica del proyecto sin elevar excesivamente el precio del producto. Sin embargo, dada la diferencia de costes entre *P. fluorescens* y *P. putida* es importante, esto podría incrementar la venta de *P. fluorescens* en detrimento de *P. putida*, haciendo su producción no rentable. Considerando este riesgo y teniendo en cuenta lo recomendable de su uso conjunto en el tratamiento de los suelos, se ha decidido equilibrar el margen de beneficios de ambas especies, estableciéndose en un 10 % para *P. putida* y en un 30 % para *P. fluorescens*. El precio de venta se determina con la siguiente fórmula:

$$\text{Precio} = \text{Coste de producción total (€/g)} / (1 - (\text{Margen de beneficios}/100))$$

Tabla 17: Precio de los productos e ingresos mensuales.

Especie	Precio Final (€/g)	Ingresos mensuales (€)
<i>T. harzianum</i>	4,53	8927,11
<i>T. atroviride</i>	4,98	8816,10
<i>P. fluorescens</i>	9,80	10663,58
<i>P. putida</i>	13,86	8171,30

Siguiendo estas previsiones los ingresos fijos mensuales ascienden a 36578,09 €.

3. PROGRAMACIÓN DE LA ACTIVIDAD

Para la programación de la actividad se va a realizar un cronograma o calendario de las acciones y trámites que se deben llevar a cabo para la instalación y puesta en marcha del proyecto, tras lo cual, una vez la línea de producción se haya establecido, se seguirá el calendario de producción mensual, mostrado en la Figura 1 y la Figura 2.

En la determinación de este cronograma se va a tomar como fecha límite para la instalación y puesta a punto de la línea, el periodo de aplicación del producto en la primavera de 2021, detallado en la Tabla 13 y la Tabla 14, de forma que para el 15 de marzo de ese año la línea de producción debe encontrarse en funcionamiento o preparada para funcionar. La programación de la actividad se va a dividir en dos etapas distintas, una centrada en los trámites administrativos de registro del producto y la otra centrada en la conformación de la línea de producción.

3.1 TRÁMITES ADMINISTRATIVOS

La ley 506/2013, de 28 de junio, sobre productos fertilizantes y su modificación del 6 de diciembre de 2017 establecen el marco legal para la producción y registro de productos fertilizantes, entre los cuales, se encuentran los considerados en el presente proyecto, encuadrados en el grupo de “Productos especiales basados en microorganismos” y denominándolos como “Abono con microorganismos no micorrízicos”. Esta establece la obligatoriedad de la inscripción del producto en el Registro de productos fertilizantes de la Dirección General de Producciones y Mercados Agrarios del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. En esta solicitud se deben incluir los siguientes datos:

ANEJO VI: PROGRAMACIÓN PARA LA EJECUCIÓN DEL PROYECTO

- El nombre o razón social, dirección y número de identificación fiscal del fabricante como responsable del producto.
- Denominación del producto conforme a lo establecido en el anexo I de la misma ley.
- Nombre comercial del producto en España.
- Instalación donde se fabrica el producto.
- Declaración detallada de las materias primas utilizadas en la fabricación (género y especie).
- Descripción del proceso de fabricación, incluyendo el método de obtención, propagación y cultivo.
- Forma de presentación del producto y modo de empleo (incompatibilidades, sustratos y condiciones en las que se haya demostrado su eficiencia).
- Declaración de características exigibles para el tipo de producto.
- Certificado analítico del producto.
- Ficha de datos de seguridad.
- Informe técnico.
- Justificación de haber presentado los microorganismos en una colección oficial.

Una vez enviada la solicitud de registro con los documentos y datos pertinentes, se establece un plazo de resolución y notificación de tres meses.

3.2 CONFORMACIÓN DE LA LÍNEA DE PRODUCCIÓN

Esta etapa se centra en la adquisición, transporte, instalación y puesta en marcha de la línea de producción. Debido a lo complejo de la maquinaria a utilizar, se requiere un periodo importante de tiempo para la construcción y envío de los equipos, que también variará dependiendo del tipo de máquina que se considere y de la localización del proveedor.

En la Tabla 18, se muestran los tiempos estimados de producción y entrega (Incluida la instalación) de cada elemento de la línea de producción:

Tabla 18: Tiempo de producción y entrega de la maquinaria.

Equipo	Localización del proveedor	Tiempo de producción (días)	Tiempo de entrega (días)	Tiempo total (días)
Autoclave Celitron A-456	Vac (Hungría)	40	5	45
Biorreactor Bionet F1 MB-3	Fuente Álamo de Murcia (España)	62	1	64
Biorreactor Bionet F2 MB-30	Fuente Álamo de Murcia (España)	72	1	74
Biorreactor Bionet F3 MB-100	Fuente Álamo de Murcia (España)	80	1	82
Liofilizador Kemolo FD-50	Hong Kong (China)	30-35	45	75-80
Cámara frigorífica Impafri	Lucena (España)	12	1	13

ANEJO VI: PROGRAMACIÓN PARA LA EJECUCIÓN DEL PROYECTO

En la elaboración del cronograma de puesta en marcha del proyecto se tendrán en cuenta las estimaciones anteriores, de forma que para la fecha límite definida, todos los equipos se hayan recibido, instalado y estén listos para entrar en funcionamiento.

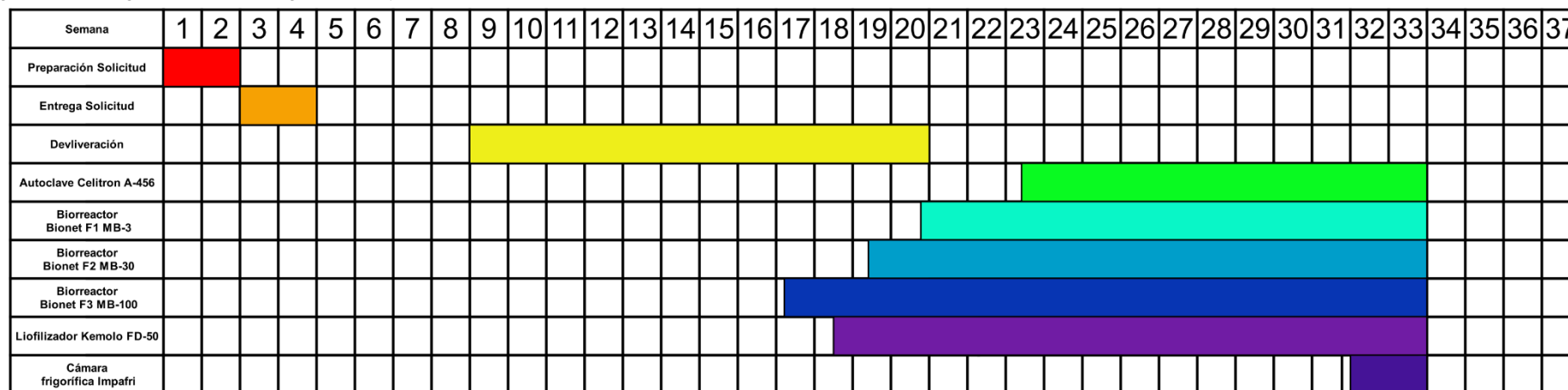
3.3 CRONOGRAMA DE LA ACTIVIDAD

Tras el análisis de los distintos requisitos para la puesta en marcha de la actividad y el proyecto, y el estudio de los tiempos que estos requieren, se ha diseñado el cronograma que se muestra en la Figura 3. Este programa considera los días laborables de un periodo de 37 semanas, iniciándose el día 29 de junio de 2020 y finalizando el día 15 de marzo de 2021. Durante este periodo se llevará a cabo la preparación, entrega y deliberación de la solicitud de registro de productos fertilizantes y la adquisición e instalación de los equipos que componen la línea de producción, información que se encuentra detallada en la Tabla 19. El cronograma se ha diseñado para asegurar la funcionalidad de la línea de producción antes de la temporada de tratamientos, fijada anteriormente, para la primavera de 2021. De esta forma se ha considerado que, por razones administrativas, la decisión sobre la solicitud de registro se va a extender más allá de los tres meses fijados por la ley, contando el mes de agosto como periodo vacacional. El periodo de resolución de la solicitud estará centrado en la compilación y revisión de las características de los equipos a adquirir, de forma que en la semana 17 se realizará el encargo de los equipos que más van a tardar en estar preparados e instalados. Finalmente, se espera que la línea productiva esté preparada un mes antes del inicio de la temporada de aplicaciones.

Tabla 19: Cronograma

Acción	Fecha de inicio	Fecha de finalización	Tiempo total (días)
Preparación solicitud	29 junio 2020	10 julio 2020	14
Entrega solicitud	13 julio 2020	24 julio 2020	14
Deliberación y resolución	1 septiembre 2020	1 diciembre 2020	91
Encargo Biorreactor F3 MB-100	3 noviembre 2020	15 febrero 2021	105
Encargo Liofilizador FD-50	5 noviembre 2020	15 febrero 2021	103
Encargo Biorreactor F2 MB-30	12 noviembre 2020	1 febrero 2021	96
Encargo Biorreactor F1 MB-3	24 noviembre 2020	15 febrero 2021	84
Encargo Autoclave A-456	18 diciembre 2021	15 febrero 2021	60
Encargo Cámara frigorífica Impafri	29 enero 2021	15 febrero 2021	18

Figura 3: Cronograma para la programación y puesta en marcha de la actividad.



Leyenda

- █ Preparación de la solicitud
- █ Entrega de la solicitud de registro
- █ Deliberación de la solicitud
- █ Construcción y entrega del liofilizador FD-50
- █ Construcción y entrega de la cámara frigorífica
- █ Construcción y entrega del biorreactor F3 MB-100
- █ Construcción y entrega del biorreactor F2 MB-30
- █ Construcción y entrega del biorreactor F1 MB-3
- █ Construcción y entrega del autoclave A-456

ANEJO VII: ESTUDIO DE IMPACTO AMBIENTAL

Índice del Anejo VII

1. INTRODUCCIÓN	1
2. LOCALIZACIÓN	1
3. ANÁLISIS AMBIENTAL	1
3.1 INVENTARIO DE LA FLORA	1
3.2 INVENTARIO DE LA FAUNA	3
3.3 MASAS DE AGUA	6
3.4 ESTUDIO DEL SUELO	6
3.5 ESTUDIO DE LA ATMÓSFERA	6
3.6 PATRIMONIO ARQUEOLÓGICO Y CULTURAL	7
3.7 ÁREAS PROTEGIDAS	7
4. IMPACTO DEL PROYECTO	7
5. EVALUACIÓN DEL IMPACTO AMBIENTAL	8
5.1 FLORA	8
5.2 FAUNA	9
5.3 SUELO	9
5.4 ATMÓSFERA	9
5.5 MASAS DE AGUA	9
5.6 PATRIMONIO ARQUEOLÓGICO Y CULTURAL	9
5.7 ÁREAS PROTEGIDAS	9
6. MEDIDAS AMORTIGUADORAS	10
6.1 MEDIDAS AMORTIGUADORAS FASE I	10
6.2 MEDIDAS AMORTIGUADORAS FASE II	10
7. CONCLUSIONES	11

1. INTRODUCCIÓN

Debido a la creciente preocupación de la sociedad por el medioambiente y el impacto que las actividades del ser humano tienen sobre este, la realización del estudio de impacto ambiental del presente proyecto, se presenta necesaria. Si bien es cierto que no existe actualmente una normativa específica, con respecto a la producción de biofertilizantes, que indique de qué manera y con qué profundidad se debe realizar el estudio del impacto ambiental, sí existen normativas que regulan la elaboración de dichos documentos en proyectos ingenieriles similares; esto unido a la naturaleza del propio proyecto, encaminado a la minimización de su impacto sobre el medioambiente, hace necesaria la elaboración de un estudio de impacto ambiental que considere los recursos naturales, paisajísticos y culturales del área en el que se va a llevar a cabo, las posibles alteraciones del medioambiente producidas por el propio proyecto, su evaluación y la sugerencia de medidas paliativas que disminuyan el impacto final del proyecto sobre el medioambiente.

Por ello en el presente anejo se llevará a cabo el análisis de los factores expuestos anteriormente.

2. LOCALIZACIÓN

La nave de producción se sitúa en las instalaciones pertenecientes a la empresa promotora de la calle Curtidores, en el polígono industrial de San Antolín, situado en el cuadrante sur-este del término municipal de Palencia (Palencia).

3. INVENTARIO AMBIENTAL

3.1 INVENTARIO DE LA FLORA

Para la elaboración del inventario de la flora vascular del área que nos ocupa se han consultado diversas publicaciones concernientes a la vegetación y los paisajes de la provincia de Palencia (J.A. Oria de Rueda Salgueiro. 2015), centrándose tanto en la tierra de campos, como en el cerrato zonas en la que se localiza o con las que limita el proyecto. Las principales especies se encuentran recogidas en la Tabla 1.

Tabla1: Listado de especies vegetales localizadas en el área de interés.

Familia	Nombre científico	Nombre vulgar
<i>Caprifoliaceae</i>	<i>Lonicera etrusca</i>	Madreselva etrusca
<i>Caprifoliaceae</i>	<i>Sambucus nigra</i>	Saúco
<i>Celastraceae</i>	<i>Euonymus europaeus</i>	Bonetero
<i>Cistaceae</i>	<i>Cistus laurifolius</i>	Estepa
<i>Cistaceae</i>	<i>Helianthemum hirtum</i>	Tamarilla
<i>Compositae</i>	<i>Staehelina dubia</i>	Pincel
<i>Cupressaceae</i>	<i>Cupressus sempervirens</i>	Ciprés
<i>Cupressaceae</i>	<i>Cupressus arizonica</i>	Arizonica
<i>Cupressaceae</i>	<i>Juniperus communis</i>	Enebro común
<i>Cupressaceae</i>	<i>Juniperus thurifera</i>	Sabina albar
<i>Ericaceae</i>	<i>Arctostaphylos uva-ursi</i>	Gayuba

Alumno: Rodrigo Herrera Sanz

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (CAMPUS DE PALENCIA). E.T.S. de Ingenierías Agrarias

Titulación: Grado en Ingeniería Forestal y del Medio Natural

ANEJO VII: ESTUDIO DE IMPACTO AMBIENTAL

<i>Fabaceae</i>	<i>Colutea arborescens</i>	Espantalobos
<i>Fabaceae</i>	<i>Dorycnium pentaphyllum</i>	Bocha
<i>Fabaceae</i>	<i>Genista scorpius</i>	Aliaga
<i>Fabaceae</i>	<i>Spartium junceum</i>	Gayomba
<i>Fagaceae</i>	<i>Quercus faginea</i>	Quejigo
<i>Fagaceae</i>	<i>Quercus ilex</i> subsp. <i>ilex</i>	Encina carrasca
<i>Labiatae</i>	<i>Lavandula latifolia</i>	Espliego
<i>Labiatae</i>	<i>Phlomis lichnitis</i>	Candilera
<i>Labiatae</i>	<i>Salvia lavandulifolia</i>	Salvia
<i>Labiatae</i>	<i>Thymus mastichina</i>	Tomillo blanco
<i>Labiatae</i>	<i>Thymus mastigosporus</i>	Tomillo picante
<i>Labiatae</i>	<i>Thymus zygis</i>	Tomillo salsero
<i>Moraceae</i>	<i>Ficus carica</i>	Higuera
<i>Moraceae</i>	<i>Morus nigra</i>	Morera negra
<i>Oleaceae</i>	<i>Fraxinus angustifolia</i>	Fresno de hoja estrecha
<i>Oleaceae</i>	<i>Jasminum fruticans</i>	Jazmín
<i>Oleaceae</i>	<i>Ligustrum vulgare</i>	Aligustre
<i>Pinaceae</i>	<i>Pinus halepensis</i>	Pino carrasco
<i>Pinaceae</i>	<i>Pinus eldarica</i>	Pino de chipre
<i>Rhamnaceae</i>	<i>Rhamnus saxatilis</i>	Espino de tintes
<i>Rosaceae</i>	<i>Crataegus monogyna</i>	Espino albar
<i>Rosaceae</i>	<i>Prunus cerasus</i>	Guindo
<i>Rosaceae</i>	<i>Prunus dulcis</i>	Almendro
<i>Rosaceae</i>	<i>Prunus domestica</i>	Ciruelo
<i>Rosaceae</i>	<i>Prunus spinosa</i>	Endrino
<i>Rosaceae</i>	<i>Pyrus communis</i>	Peral
<i>Rosaceae</i>	<i>Rosa canina</i>	Escaramujo
<i>Rosaceae</i>	<i>Rubus ulmifolius</i>	Zarzamora
<i>Rosaceae</i>	<i>Sorbus domestica</i>	Serval
<i>Salicaceae</i>	<i>Populus alba</i>	Álamo blanco
<i>Salicaceae</i>	<i>Populus nigra</i>	Álamo negro
<i>Salicaceae</i>	<i>Populus x euroamericana</i>	Chopo híbrido
<i>Salicaceae</i>	<i>Salix alba</i>	Sauce blanco
<i>Salicaceae</i>	<i>Salix atrocinerea</i>	Sauce cenizo
<i>Salicaceae</i>	<i>Salix elaeagnos</i>	Sauce gris
<i>Salicaceae</i>	<i>Salix fragilis</i>	Mimbrera frágil
<i>Salicaceae</i>	<i>Salix purpurea</i>	Mimbrera púrpura
<i>Salicaceae</i>	<i>Salix triandra</i>	Mimbrera oscura
<i>Ulmaceae</i>	<i>Ulmus minor</i>	Olmo común

A la lista de especies mostradas en la Tabla 1 se deben añadir los principales cultivos de la zona, mayoritariamente de secano, entre los que destacan *Hordeum vulgare*, *Triticum* spp., *Helianthus annuus*, *Vitis vinifera* y cultivos de la familia *Fabaceae* pero también de regadío, como *Zea mays*, *Medicago sativa* y *Beta vulgaris*.

No aparecen especies vegetales en peligro de extinción, amenazadas o que requieran una protección especial.

3.2 INVENTARIO DE LA FAUNA

Para la realización del inventario de la fauna del área en el que se desarrolla en el proyecto se ha recurrido al Inventario Español de Especies Terrestres, proporcionado por el Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico, en el que se recogen las especies de vertebrados terrestres encontradas en España y su distribución. El catálogo elegido es el correspondiente al cuadrante de coordenadas UTM: 30TUM44, que abarca una superficie de 100 km².

Las especies de vertebrados localizadas en la zona en la que se pretende desarrollar el proyecto se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2: Listado de especies de vertebrados localizadas en el área de interés

Clase	Nombre científico	Nombre vulgar
Aves	<i>Acrocephalus arundinaceus</i>	Carricero tordal
Aves	<i>Acrocephalus scirpaceus</i>	Carricero común
Aves	<i>Alauda arvensis</i>	Alondra común
Aves	<i>Alectoris rufa</i>	Perdiz roja
Aves	<i>Anas platyrhynchos</i>	Ánade azulón
Aves	<i>Anas strepera</i>	Ánade friso
Aves	<i>Anthus campestris</i>	Bisbita campestre
Aves	<i>Apus apus</i>	Vencejo común
Aves	<i>Ardea cinerea</i>	Garza real
Aves	<i>Asio otus</i>	Búho Chico
Aves	<i>Athene noctua</i>	Mochuelo europeo
Aves	<i>Burhinus oediconemus</i>	Alcaraván común
Aves	<i>Buteo buteo</i>	Busardo ratonero
Aves	<i>Calandrella brachydactyla</i>	Terrera común
Aves	<i>Carduelis cannabina</i>	Pardillo común
Aves	<i>Carduelis chloris</i>	Verderón común
Aves	<i>Cettia cetti</i>	Ruiseñor bastardo
Aves	<i>Charadrius alexandrinus</i>	Chorlitejo patinegro
Aves	<i>Charadrius dubius</i>	Chorlitejo chico
Aves	<i>Chlidonias hybrida</i>	Fumarel cariblanco
Aves	<i>Ciconia ciconia</i>	Cigüeña blanca
Aves	<i>Circus aeruginosus</i>	Aguilucho lagunero occidental
Aves	<i>Circus cyaneus</i>	Aguilucho pálido
Aves	<i>Circus pygargus</i>	Aguilucho cenizo
Aves	<i>Cisticola juncidis</i>	Buitrón
Aves	<i>Clamator glandarius</i>	Crialo europeo
Aves	<i>Columba livia</i>	Paloma bravía
Aves	<i>Columba oenas</i>	Paloma zurita
Aves	<i>Columba palumbus</i>	Paloma torcaz
Aves	<i>Corvus corax</i>	Cuervo
Aves	<i>Corvus corone</i>	Corneja
Aves	<i>Corvus monedula</i>	Grajilla
Aves	<i>Coturnix coturnix</i>	Codorniz común

Alumno: Rodrigo Herrera Sanz

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (CAMPUS DE PALENCIA). E.T.S. de Ingenierías Agrarias

Titulación: Grado en Ingeniería Forestal y del Medio Natural

ANEJO VII: ESTUDIO DE IMPACTO AMBIENTAL

Aves	<i>Cuculus canorus</i>	Cuco común
Aves	<i>Delichon urbicum</i>	Avión común
Aves	<i>Emberiza calandra</i>	Triguero
Aves	<i>Emberiza hortulana</i>	Escribano hortelano
Aves	<i>Falco naumanni</i>	Cernícalo primilla
Aves	<i>Falco peregrinus</i>	Halcón peregrino
Aves	<i>Falco subbuteo</i>	Alcotán europeo
Aves	<i>Fulica atra</i>	Focha común
Aves	<i>Galerida cristata</i>	Cogujada común
Aves	<i>Galerida theklae</i>	Cogujada montesina
Aves	<i>Gallinula chloropus</i>	Gallineta común
Aves	<i>Himantopus himantopus</i>	Cigüeñuela común
Aves	<i>Hirundo rustica</i>	Golondrina común
Aves	<i>Lanius senator</i>	Alcaudón común
Aves	<i>Larus michahellis</i>	Gaviota patiamarilla
Aves	<i>Larus ridibundus</i>	Gaviota reidora
Aves	<i>Luscinia megarhynchos</i>	Ruiseñor común
Aves	<i>Melanocorypha calandra</i>	Calandria
Aves	<i>Merops apiaster</i>	Abejaruco europeo
Aves	<i>Milvus migrans</i>	Milano real
Aves	<i>Motacilla cinerea</i>	Lavandera cascadeña
Aves	<i>Motacilla flava</i>	Lavandera boyera
Aves	<i>Oenanthe oenanthe</i>	Collalba negra
Aves	<i>Oriolus oriolus</i>	Oropéndola
Aves	<i>Otis tarda</i>	Avutarda común
Aves	<i>Otus scops</i>	Autillo europeo
Aves	<i>Parus major</i>	Carbonero común
Aves	<i>Passer domesticus</i>	Gorrión común
Aves	<i>Passer montanus</i>	Gorrión molinero
Aves	<i>Petronia petronia</i>	Gorrión chillón
Aves	<i>Phoenicurus ochruros</i>	Colirrojo tizón
Aves	<i>Pica pica</i>	Urraca
Aves	<i>Picus viridis</i>	Pito real
Aves	<i>Podiceps nigricollis</i>	Zampullín cuellinegro
Aves	<i>Pterocles orientalis</i>	Ganga ortega
Aves	<i>Recurvirostra avosetta</i>	Avoceta común
Aves	<i>Riparia riparia</i>	Avión zapador
Aves	<i>Saxicola torquatus</i>	Tarabilla africana
Aves	<i>Serinus serinus</i>	Verdecillo
Aves	<i>Streptopelia decaocto</i>	Tórtola turca
Aves	<i>Streptopelia turtur</i>	Tórtola europea
Aves	<i>Strix aluco</i>	Cárabo común
Aves	<i>Sturnus unicolor</i>	Estornino negro
Aves	<i>Sylvia atricapilla</i>	Curruca capirotada
Aves	<i>Sylvia cantillans</i>	Curruca carrasqueña
Aves	<i>Sylvia communis</i>	Curruca zarcera
Aves	<i>Sylvia conspicillata</i>	Curruca tomillera
Aves	<i>Tetrax tetrax</i>	Sisón común
Aves	<i>Tringa totanus</i>	Archibebe común
Aves	<i>Troglodytes troglodytes</i>	Chochín

Alumno: Rodrigo Herrera Sanz

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (CAMPUS DE PALENCIA). E.T.S. de Ingenierías Agrarias

Titulación: Grado en Ingeniería Forestal y del Medio Natural

ANEJO VII: ESTUDIO DE IMPACTO AMBIENTAL

Aves	<i>Turdus merula</i>	Mirlo común
Aves	<i>Tyto alba</i>	Lechuza común
Aves	<i>Upupa epops</i>	Abubilla
Aves	<i>Vanellus vanellus</i>	Avefría europea
Anfibios	<i>Bufo calamita</i>	Sapo corredor
Anfibios	<i>Pelobates cultripes</i>	Sapo de espuelas
Anfibios	<i>Pelophylax perezi</i>	Rana común
Anfibios	<i>Pleurodeles waltl</i>	Gallipato
Mamíferos	<i>Apodemus sylvaticus</i>	Ratón de campo
Mamíferos	<i>Canis lupus</i>	Lobo
Mamíferos	<i>Crocidura russula</i>	Musaraña gris
Mamíferos	<i>Erinaceus europaeus</i>	Erizo europeo
Mamíferos	<i>Lepus granatensis</i>	Liebre ibérica
Mamíferos	<i>Martes foina</i>	Garduña
Mamíferos	<i>Microtus duodecimcostatus</i>	Topillo mediterráneo
Mamíferos	<i>Microtus lusitanicus</i>	Topillo lusitánico
Mamíferos	<i>Mustela erminea</i>	Armiño
Mamíferos	<i>Mustela nivalis</i>	Comadreja
Mamíferos	<i>Mus musculus</i>	Ratón común
Mamíferos	<i>Mus spretus</i>	Ratón moruno
Mamíferos	<i>Myotis daubentonii</i>	Murciélago ratonero ribereño
Mamíferos	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	Conejo
Mamíferos	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	Murciélago común
Mamíferos	<i>Pipistrellus pygmaeus</i>	Murciélago de cabrera
Mamíferos	<i>Plecotus austriacus</i>	Murciélago orejudo gris
Mamíferos	<i>Rattus norvegicus</i>	Rata parda
Mamíferos	<i>Sus scrofa</i>	Jabalí
Mamíferos	<i>Talpa occidentalis</i>	Topo ibérico
Mamíferos	<i>Vulpes vulpes</i>	Zorro
Reptiles	<i>Chalcides bedriagai</i>	Eslizón común
Reptiles	<i>Chalcides striatus</i>	Eslizón tridáctilo
Reptiles	<i>Lacerta lepida</i>	Lagarto ocelado
Reptiles	<i>Malpolon monspessulanus</i>	Culebra bastarda
Reptiles	<i>Natrix maura</i>	Culebra viperina
Reptiles	<i>Natrix natrix</i>	Culebra de collar
Reptiles	<i>Podarcis hispanica</i>	Lagartija ibérica
Reptiles	<i>Psammotromus algirus</i>	Lagartija colilarga

Se puede decir que ninguna de las especies incluidas en la Tabla 2 se encuentra clasificada como amenazada por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN); sin embargo, ciertas especies tales como *Chalcides bedriagai*, *Tetrax tetrax*, *Timón lepidus* o *Pelobates cultripes*, presentan un cierto nivel de preocupación, encontrándose en la clasificación “near threatened” (NT). Un caso especial es el de *Canis lupus* subsp. *signatus* el cual no se encuentra amenazado en la zona norte de la región, pero sí en la zona sur donde se clasifica como “vulnerable” (VU), utilizando el río Duero como demarcación.

Por ello, y a pesar de que no existe ninguna obligación legal se va a intentar minimizar el posible impacto del proyecto sobre estas especies.

3.3 MASAS DE AGUA

Las únicas masas y/o corrientes de agua cercanas a la localización del proyecto son el río Carrión y el río Pisuega, de forma que las siguientes masas de agua más cercanas, de importancia para el presente estudio, son la laguna de la Nava y el Canal de Castilla en su ramal de Campos, que se encuentran a 21,7 km y a 25,6 km respectivamente.

3.4 ESTUDIO DEL SUELO

Debido a la naturaleza del proyecto el estudio detallado de los suelos de la zona no resulta necesario ni práctico, ya que la actividad que en él se desarrolla se realizará en una nave cerrada de forma que la probabilidad de dañar el suelo es prácticamente nula. Sin embargo, se ha realizado una breve búsqueda sobre las características de los suelos de la zona para crear una imagen lo más fiel posible a la realidad y para complementar este análisis de impacto ambiental.

La información aquí expuesta se ha obtenido de la página web del Instituto Geológico y Minero de España (IGME), a través de su visor en el que se utilizó como referencia la capa MAGNA de escala 1:50000.

Como visión general en la zona se encuentran suelos de textura arenosa y limosa, aunque también se encuentran texturas arcillosas en zonas de pendiente; compuestos principalmente por yesos, cuarcitas y dolomías.

3.5 ESTUDIO DE LA ATMÓSFERA

Como en casos anteriores el estudio de la atmósfera del municipio de Palencia no es esencial para la consecución del presente estudio de impacto ambiental debido a la naturaleza del proyecto y al hecho de que se va a llevar a cabo en el interior de una nave, por lo que el riesgo de daño de la atmósfera de la zona es mínimo. Sin embargo, se va a realizar un breve resumen de la calidad atmosférica y de su dinámica con el objetivo de complementar el análisis de impacto ambiental.

La información utilizada proviene del Plan General de Ordenación Urbana de Palencia (PGOUP), elaborado en 2008, que en su décimo tomo se centra en el impacto ambiental y del informe de la calidad del aire elaborado por la Junta de Castilla y León en el año 2018.

En cuanto a la calidad del aire en el municipio de Palencia los datos consultados indican que no existen grandes problemas de contaminación ya que, con respecto al año 2018 no se alcanzaron valores críticos, dañinos para la salud, para ninguno de los principales contaminantes principalmente SO₂, NO₂, CO; excepto para el O₃ cuyos valores críticos se superaron una única vez en el año.

Con respecto a la dirección del viento en el estudio de impacto ambiental correspondiente al PGPOUP se indica que el viento dominante en el área en el que se va a desarrollar el proyecto es de componente noreste, seguido por el viento norte y noroeste, mientras que los vientos de componente sur presentan una importancia menor. De esta forma y debido a la localización y naturaleza del proyecto se puede determinar que en ningún caso la atmósfera del municipio se verá afectada por la actividad del proyecto, manteniendo su calidad normal.

3.6 PATRIMONIO ARQUEOLÓGICO Y CULTURAL

En la zona considerada no se encuentran yacimientos arqueológicos y/o culturales protegidos.

3.7 ÁREAS PROTEGIDAS

No existen en la zona considerada áreas protegidas por figuras de protección medioambiental que puedan verse afectadas por el desarrollo del proyecto.

4. IMPACTO DEL PROYECTO

Debido a que en el presente proyecto no se necesita realizar importantes obras con un fuerte impacto sobre el terreno, el impacto del proyecto sobre el medioambiente va a ser reducido; sin embargo, no va a ser nulo. El proyecto, centrado en la producción y venta de microorganismos, va a producir residuos y alteraciones de distinta naturaleza que pueden afectar al medio que lo rodea. Estas alteraciones se van a producir en dos fases distintas del proyecto, que son la puesta en marcha de la línea de producción y la fase de producción y explotación.

La fase de puesta en marcha de la línea de producción engloba todos los trabajos y actividades que se deben llevar a cabo para instalar la maquinaria que conforma la línea de producción en su lugar, esto incluye el transporte e instalación de la maquinaria. Durante este proceso se van a producir alteraciones en el medio en diversas formas:

-Emisiones de gases: Durante la entrega e instalación de la maquinaria se va a requerir el uso de vehículos y maquinaria pesada que constituyen fuentes de gases contaminantes al funcionar con gasoil y/o gasolina. Principalmente estos gases van a ser óxidos de azufre (SO_2 y SO_3), óxidos de nitrógeno (N_2O , NO y NO_2), óxidos de carbono (CO), compuestos orgánicos volátiles y partículas.

-Emisiones de líquidos: Pueden llegar a producirse pequeños vertidos de líquidos contaminantes como grasa, aceites, gasoil y/o gasolina, vertidos por la maquinaria utilizada.

-Contaminación acústica: Esta será producida por la maquinaria utilizada para la entrega de cada una de las partes que componen la línea de producción, es decir camiones y grúas, y durante los procesos de instalación y ensamblaje debido al uso de taladradoras, martillos y otras herramientas.

-Residuos: Materiales potencialmente contaminantes, principalmente plásticos, van a ser generados en esta etapa del proyecto a partir de los embalajes en los que la maquinaria va a ser entregada.

Otras posibles alteraciones del medioambiente, como vibraciones y erosión del terreno, no se consideran en este proyecto, debido a que no se van a realizar importantes obras que requieran el movimiento de tierra y la formación de terraplenes y desmontes.

Durante la segunda fase del proyecto, la fase de explotación, se espera que el posible impacto sobre el medioambiente sea considerablemente menor debido a que no se requiere el uso de maquinaria pesada, que constituye la principal fuente de emisiones y contaminación en la primera etapa. Sin embargo, durante esta etapa también se pueden producir alteraciones a considerar:

-Emisiones de gases: Durante los procesos de crecimiento y reproducción llevados a cabo por los hongos y bacterias a producir, se generarán cantidades significantes de CO₂. También se debe tener en consideración los gases emitidos por los vehículos encargados del suministro de materias primas y la recogida de la producción; aunque la incidencia de estos será mucho menor a la de los vehículos y maquinaria utilizados durante la primera fase.

-Emisiones de líquidos: El crecimiento y la multiplicación de *Trichoderma spp.* y *Pseudomonas spp.* se va a llevar a cabo en distintos medios de cultivo, agua de trigo y *nutrient broth* (NB) respectivamente. Estos medios están constituidos por compuestos orgánicos biodegradables, por lo que su impacto en el medio será muy reducido, siendo la eutrofización del agua, la mayor consecuencia de una hipotética mala gestión de estos residuos. Por otro lado, se espera que estos organismos produzcan compuestos, principalmente de naturaleza antibiótica que pueden afectar al medio.

También pueden producirse emisiones de líquidos de otra naturaleza, como lubricantes, grasas y aceites al llevarse a cabo las labores de mantenimiento de la maquinaria, aunque en una escala muy pequeña.

5. EVALUACIÓN DEL IMPACTO AMBIENTAL

5.1 FLORA

Debido a las características del proyecto, expuestas anteriormente, se puede considerar que la flora de la zona no se encuentra amenazada por el proyecto que se plantea.

La fase que mayor riesgo supone para la flora del entorno es la fase de instalación y puesta en marcha de la línea productiva, debido a la naturaleza de las emisiones, siendo las emisiones de gases las potencialmente más dañinas. Sin embargo, el tiempo requerido para completar esta fase del proyecto es breve por lo que no se prevé un gran impacto sobre la flora.

Durante la segunda fase del proyecto, la explotación y producción, constituye un peligro incluso menor que la primera debido a la naturaleza inocua de las emisiones en esta etapa y a su realización en interiores.

Únicamente en casos de negligencia, mal estado de la maquinaria a utilizar y/o mala gestión de los residuos, la flora del entorno podría verse afectada.

5.2 FAUNA

El principal factor que puede alterar a la fauna de la zona es la contaminación acústica producida durante la primera fase del proyecto, mientras que el impacto de las emisiones de gases y líquidos se espera muy limitado debido a la evasión de la zona por la fauna ante las actividades llevadas a cabo.

Por su parte, la segunda fase del proyecto no constituye ningún riesgo ni alteración para la fauna, al llevarse a cabo en instalaciones cerradas.

Al igual que la flora, la fauna solo se vería afectada en caso de negligencia, uso de maquinaria en mal estado y/o mala gestión de residuos.

5.3 SUELO

Debido a que la mayor parte del proyecto será desarrollado en el interior de una nave adecuada para ello el impacto en el suelo de la zona es prácticamente nulo, ya que la nave fue construida con anterioridad y las comunicaciones se realizan a través de la red de carreteras del estado. Sin embargo, es cierto que existe cierto riesgo de dañar el suelo del entorno si se produce un vertido significativo de combustible, aceites o grasas.

5.4 ATMÓSFERA

La atmósfera se va a ver significativamente afectada debido a la concentración de maquinaria durante la instalación de la línea productiva, reduciendo la calidad del aire y liberando gases contaminantes, aunque hay que tener en cuenta que esta fase será de corta duración, por lo que la calidad de la atmósfera no se verá afectada a medio y largo plazo.

5.5 MASAS DE AGUA

Como las emisiones de líquidos potencialmente contaminantes consideradas para este proyecto son de escala y alcance muy pequeño, se considera que las masas de agua más cercanas, el río Carrión y el río Pisuerga, no se van a ver afectadas por la actividad del proyecto.

5.6 PATRIMONIO ARQUEOLÓGICO Y CULTURA

El patrimonio arqueológico y cultural no se va a ver dañado y/o afectado por el proyecto en el que se trabaja.

5.7 ÁREAS PROTEGIDAS

No se espera ningún impacto sobre ningún tipo de área protegida por parte del presente proyecto debido a la ausencia de estas en la zona.

6. MEDIDAS AMORTIGUADORAS

Tras el análisis y estudio del posible impacto del proyecto sobre el medio que le rodea se ha llegado a la conclusión de que el riesgo de provocar importantes daños al medioambiente es muy bajo, tanto por la naturaleza del proyecto, como por las características del medio en el que se va a localizar. Debido al limitado impacto del proyecto y a las características del medio, sin zonas protegidas, especies amenazadas, grandes masas de agua susceptibles y con una buena calidad del aire, se considera que no es necesario aplicar medidas especiales para proteger el medio o llevar a cabo la modificación del proyecto para reducir su impacto. Sin embargo, sí se considera necesario establecer unas pautas y reglas para minimizar la influencia del proyecto en el medio que lo rodea.

6.1 MEDIDAS AMORTIGUADORAS EN LA FASE I

Durante la primera fase del proyecto, la fase de instalación, la principal fuente de emisiones potencialmente dañinas para el medioambiente proviene de la maquinaria y vehículos utilizados para la entrega e instalación de la maquinaria que va a componer la línea de producción. Para minimizar su impacto se establecen las siguientes pautas:

- Los vehículos y maquinaria utilizados deberán haber superado los controles pertinentes exigidos por la administración para cada tipo de vehículo, concernientes a los niveles de emisiones de gases y ruido.
- Los vehículos y maquinaria deben encontrarse en buen estado de mantenimiento, asegurándose de que no se produzcan pérdidas de aceites y/o combustible.
- En la medida de lo posible se adaptará la programación del proyecto para tratar de llevar a cabo la instalación de cada una de las partes que componen la línea de producción en las mismas fechas, de forma que el proceso no se alargue más de lo necesario.
- Se dispondrá del número necesario de contenedores para el separado y posterior reciclado de los distintos tipos de residuos que se produzcan, principalmente plásticos, papel-cartón, metales y cristal.

6.2 MEDIDAS AMORTIGUADORAS EN LA FASE II

Durante la fase de explotación los residuos y líquidos generados durante la producción de *Trichoderma spp.* y *Pseudomonas spp.*, constituyen el principal riesgo para el medioambiente. Si bien hay que recordar que su potencial impacto es prácticamente inexistente, es necesario llevar a cabo una correcta gestión de estos residuos. Para ello se establecen las siguientes pautas:

- Tras la separación de los organismos y el medio líquido en el que fueron producidos, se obtendrá únicamente agua destilada, proveniente de la humedad sublimada durante el liofilizado. Este nunca será reutilizado para labores de limpieza y desinfección.

7. CONCLUSIONES

Tras el análisis del medio en el que se localiza el proyecto y el posible impacto que este puede tener en el entorno se considera que constituye un riesgo muy pequeño para el medioambiente siempre y cuando se lleve a cabo correctamente, siguiendo las determinaciones que definen el proyecto. Sin embargo y siguiendo la filosofía de este proyecto se han determinado ciertas pautas para minimizar los posibles, pero improbables daños del entorno.

ANEJO VIII: ESTUDIO BÁSICO DE SEGURIDAD Y SALUD

Índice del Anejo VIII

1. INTRODUCCIÓN	1
2. CARACTERÍSTICAS GENERALES	1
2.1 NATURALEZA DEL PROYECTO	1
2.2 AUTOR DEL ESTUDIO BÁSICO DE SEGURIDAD Y SALUD	1
2.3 LEGISLACIÓN APLICABLE	1
3. IDENTIFICACIÓN DE LOS RIESGOS	2
3.1 TRABAJOS PREVIOS	2
3.2 INSTALACIÓN DE LA MAQUINARIA	2
3.3 FASE DE EXPLOTACIÓN	3
4. MEDIDAS PREVENTIVAS	3
4.1 TRABAJOS PREVIOS	3
4.2 INSTALACIÓN DE LA MAQUINARIA	4
4.3 FASE DE EXPLOTACIÓN	5
4.3.1 Medidas generales	5
4.3.2 Protección contra incendios	6
4.3.3 Protección personal	6
4.3.4 Señalización	6
5. MEDICIONES	6
5.1 EPÍGRAFE. I. MEDIDAS GENERALES	6
5.2 EPÍGRAFE. II. PROTECCIÓN CONTRA INCENDIOS	7
5.3 EPÍGRAFE. III. PROTECCIÓN PERSONAL	7
5.4 EPÍGRAFE. IV. SEÑALIZACIÓN	7
6. ÍNDICE DE PRECIOS	8
7. PRESUPUESTOS: PARCIALES	8
7.1 MEDIDAS GENERALES	8

7.2 PROTECCIÓN CONTRA INCENDIOS	8
7.3 PROTECCIÓN PERSONAL	8
7.4 SEÑALIZACIÓN	9
8. PRESUPUESTOS: RESUMEN	9

1. INTRODUCCIÓN

El presente anejo se centra en el estudio y evaluación del proyecto conforme a los riesgos que este constituye para la seguridad y la salud de los trabajadores implicados en su puesta en marcha y explotación. La legislación vigente establece la necesidad de redacción de un estudio en el que se identifiquen y evalúen todos los peligros que las actividades incluidas en el proyecto constituyen para los trabajadores, además de la proposición y puesta en marcha de medidas que eviten estos riesgos y/o que aseguren la integridad física de los trabajadores. Sin embargo, la normativa recoge la posibilidad de realizar un estudio básico de seguridad y salud, de menor extensión y profundidad, aunque no se precisan los casos en los que se pueden llevar a cabo estos estudios simplificados en proyectos de la naturaleza del que nos ocupa. En el caso específico del presente proyecto se realizará el estudio básico, simplificado, de seguridad y salud debido a su pequeño tamaño.

2. CARACTERÍSTICAS GENERALES

2.1 NATURALEZA DEL PROYECTO

El presente proyecto titulado “Proyecto de diseño de una línea de producción de hongos y bacterias micorrícicos para la mejora de suelos forestales” se centra en el estudio y análisis de las especies de hongos ascomicetes *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma atroviride* y las especies de bacterias *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas putida* y el posterior desarrollo y diseño de su ciclo productivo y de su línea de producción.

Para la exitosa consecución del proyecto se requiere de experimentación y trabajo de laboratorio, que se realizará en el propio laboratorio del promotor, además de la elección e instalación de la maquinaria y los elementos constituyentes de la línea de producción en las instalaciones recientemente adquiridas para este propósito; es por ello que no se requiere la puesta en marcha de ningún tipo de obra.

2.2 AUTOR DEL ESTUDIO BÁSICO DE SEGURIDAD Y SALUD

El autor del presente estudio básico de seguridad y salud de aplicación obligada en el proyecto de nombre “Proyecto de diseño de una línea de producción de hongos y bacterias micorrícicos para la mejora de suelos forestales” es D. Rodrigo Herrera Sanz.

2.3 LEGISLACIÓN APLICABLE

La legislación que determina las normas y criterios a seguir en la redacción del estudio básico de seguridad y salud del presente proyecto es la siguiente:

- Ley 31/1995, de 8 de noviembre, de prevención de riesgos laborales y su última modificación del 29 de diciembre de 2014
- Real Decreto 374/2001, de 6 de abril, sobre la protección de la salud y seguridad de los trabajadores contra los riesgos relacionados con los agentes químicos durante el trabajo y su modificación por parte del Real Decreto 598/2015, de 3 de julio

ANEJO VIII: ESTUDIO BÁSICO DE SEGURIDAD Y SALUD

- 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
- Real Decreto 485/1997, de 14 de abril, sobre disposiciones mínimas en materia de señalización de seguridad y salud en el trabajo y su modificación por parte del Real Decreto 598/2015, de 3 de julio
- Real Decreto 773/1997, de 30 de mayo, sobre disposiciones mínimas de seguridad y salud relativas a la utilización por los trabajadores de equipos de protección individual
- Real Decreto 1215/1997, de 18 de julio, por el que se establecen las disposiciones mínimas de seguridad y salud para la utilización por los trabajadores de los equipos de trabajo
- Real Decreto 513/2017, de 22 de mayo, por el que se aprueba el reglamento de instalaciones de protección contra incendios

3. IDENTIFICACIÓN DE LOS RIESGOS

3.1 TRABAJOS PREVIOS

Los trabajos previos, centrados en la experimentación, testeo y desarrollo de los protocolos de producción, presentan los riesgos propios del trabajo experimental en laboratorio, siendo los más importantes los numerados a continuación:

- Pinchazos y cortes con las herramientas utilizadas durante la experimentación (bisturís, escalpelos, etc...)
- Explosión e incendios por combustión de los reactivos y/o equipos manejados.
- Caídas al mismo nivel producidos por suelos resbaladizos
- Contactos térmicos debido al trabajo y manipulación con sustancias y equipos a distintas temperaturas (Mecheros, Autoclaves, etc...)
- Contacto con productos químicos durante su manipulación y uso en las distintas fases de la experiencia (Midori green, etc...)
- Inhalación de humos y gases generados en las reacciones químicas
- Exposición a radiaciones dañinas, principalmente ultravioleta, durante la puesta en marcha de ciertos equipos de trabajo y en procesos de esterilización (Campana de gases)
- Exposición a los agentes biológicos con los que se trabaja; hongos y bacterias

3.2 INSTALACIÓN DE LA MAQUINARIA

Durante la recepción, instalación y prueba de la maquinaria que compone las líneas productivas se llevarán a cabo labores que pueden constituir riesgos importantes para la salud e integridad física de los trabajadores involucrados en el proceso. Los más relevantes se citan a continuación:

- Pinchazos y cortes con las herramientas utilizadas durante el proceso de instalación
- Aplastamientos durante la descarga, posicionamiento e instalación de la maquinaria
- Atropellos y auto atropellos durante la recepción y descarga
- Golpes y choques contra objetos producidos durante el proceso de instalación
- Explosiones e incendios producidos por la maquinaria y/o las herramientas utilizadas
- Contactos eléctricos

ANEJO VIII: ESTUDIO BÁSICO DE SEGURIDAD Y SALUD

- Caídas al mismo y a distinto nivel producidas por suelos resbaladizos o tropiezos y durante la descarga e instalación de la maquinaria
- Contactos térmicos con elementos a distintas temperaturas
- Inhalación de humos y gases producidos durante el uso de herramientas y manipulación de maquinaria
- Exposición a ruidos durante la utilización de herramientas

3.3 FASE DE EXPLOTACIÓN

La fase de explotación, debido a su naturaleza y duración, constituye la principal fuente de riesgos para la salud e integridad física de los trabajadores del presente proyecto. Se estima que la cantidad de mano de obra necesaria para llevar a cabo los trabajos en la explotación de la línea de producción asciende a cuatro empleados, encargados de la línea de producción y de la recepción y almacenaje de los suministros.

Para garantizar la salud de estos trabajadores se debe tener especial consideración en su análisis y en las medidas a tomar en la reducción de estos riesgos.

- Pinchazos o cortes producidos por el uso de utensilios y herramientas cortantes durante la recepción de los materiales y su manipulación durante el proceso productivo
- Proyección de fluidos a presión durante la utilización de la maquinaria y/o mantenimiento de esta
- Atropellos durante las labores de recepción y descarga de materiales
- Golpes por caída de objetos durante su manipulación
- Explosiones e incendios producidos por posibles fallos en la maquinaria y/o por la incorrecta manipulación de químicos y otros productos
- Caídas al mismo nivel por suelos resbaladizos o tropiezos
- Caídas a distinto nivel en diversas labores del proceso productivo
- Contactos térmicos con sustancias y maquinaria a altas temperaturas
- Contacto con productos químicos de naturaleza ácida y alcalina
- Inhalación de gases producidos por el propio desarrollo de los hongos y bacterias y por la propia maquinaria
- Exposición a ruido generado por herramientas y maquinaria durante su funcionamiento
- Exposición a agentes biológicos, principalmente los hongos y bacterias con los que se trabaja

4. MEDIDAS PREVENTIVAS

4.1 TRABAJOS PREVIOS

Esta fase del proyecto se llevará a cabo en el laboratorio perteneciente al promotor; es por ello por lo que la seguridad y salud de los trabajadores en estas instalaciones se encuentra supeditada a los protocolos de seguridad y salud previamente establecidos para estas instalaciones. Entre las medidas que estos incluyen destacan:

- Consecución de los trabajos y tareas por personal formado y acreditado para ello

ANEJO VIII: ESTUDIO BÁSICO DE SEGURIDAD Y SALUD

-Utilización de los equipos de protección individual por parte del personal del laboratorio

En este se incluyen:

- Guantes
- Bata de laboratorio
- Gafas protectoras
- Mascarillas modelo FFP3

-Correcto uso de los equipos de laboratorio, utilizándolos únicamente para lo que fueron diseñados.

-Mantenimiento de los equipos de laboratorio.

-Correcta manipulación y almacenamiento de productos químicos, siguiendo las indicaciones del fabricante.

-Protocolo anti incendios bien definido y conocido por el personal, con la correcta señalización de las salidas de emergencia y la posición de los medios de extinción activos (extintor de CO₂)

-Botiquín de urgencias. Este incluye:

- Desinfectantes y antisépticos autorizados.
- Gasas estériles.
- Vendas.
- Algodón hidrófilo.
- Esparadrapo.
- Apósitos adhesivos.
- Tijeras.
- Pinzas.
- Guantes desechables.

-Disposición de los principales números de emergencias (Bomberos, Emergencias sanitarias, etc...)

4.2 INSTALACIÓN DE LA MAQUINARIA

El proceso de formación de la línea de producción será llevado a cabo por las empresas suministradoras de estos equipos. De esta forma serán los empleados de las empresas suministradoras los que lleven a cabo las tareas de descarga, instalación, puesta en marcha y prueba de la maquinaria y los elementos que componen la línea de producción. Es por ello por lo que, en esta fase del proyecto, la seguridad y salud del personal involucrado en ella, estará garantizada por las empresas suministradoras, siendo ellas las encargadas de:

-Asegurarse de que los trabajadores realizan las tareas para las que han sido formados y/o tienen acreditación.

-Asegurarse de que su personal sigue las directrices de seguridad y salud en el trabajo, siguiendo los protocolos establecidos para la descarga e instalación de la maquinaria.

-Proporcionar a los trabajadores de las herramientas y materiales adecuadamente homologados por el Ministerio de Trabajo, Migraciones y Seguridad Social.

-Llevar a cabo y asegurarse del correcto mantenimiento de los vehículos y herramientas a utilizar.

-Proporcionar a los trabajadores de equipos de protección individual correctamente homologados por el Ministerio de Trabajo, Migraciones y Seguridad Social.

En cualquier caso, se pondrá a disposición del personal que lleve a cabo la instalación de la maquinaria, todos los elementos de seguridad y salud de los que se disponga en las instalaciones en las que se situará la línea de producción (extintores, botiquín, etc...) con el fin de reducir los riesgos al mínimo posible.

4.3 FASE DE EXPLOTACIÓN

Debido a su duración, la fase de explotación puede considerarse como la de mayor peligro para la integridad física y la salud de los trabajadores. Es por ello por lo que la planificación y definición de las medidas preventivas y mitigadoras de los riesgos a tomar, adquiere especial importancia.

4.3.1 Medidas generales

-Debido a la naturaleza y tamaño del proyecto, el responsable del ámbito de la seguridad y salud del personal recaerá sobre el promotor, cuya obligación será la de garantizar las medidas y protocolos de seguridad y su actualización.

-Los trabajadores deberán someterse a un reconocimiento médico previo al inicio del trabajo, lo que permitirá la mejora de los planes de seguridad.

-Las tareas y trabajos a realizar serán llevados a cabo única y exclusivamente por personal formado, acreditado y autorizado para su consecución.

-Se contará como servicio médico el de la localidad de Palencia, municipio en el que se desarrolla el proyecto.

-Se dispondrá de un botiquín cuya localización deberá ser conocida por los trabajadores y en el que se incluirán:

- Desinfectantes y antisépticos autorizados.
- Gasas estériles.
- Vendas.
- Algodón hidrófilo.
- Esparadrapo.
- Apósitos adhesivos.
- Tijeras.
- Pinzas.
- Guantes desechables.

4.3.2 Protección contra incendios

Las instalaciones serán dotadas con equipos de extinción de incendios, tres extintores de nieve carbónica CO₂ homologados cuya localización será conocida por todos los miembros del personal y cuya instalación y mantenimiento será llevado a cabo por empresas autorizadas y habilitadas por el órgano competente de la comunidad autónoma. Además, se instalarán carteles de alta visibilidad que indiquen la posición de las salidas.

4.3.3 Protección personal

Todos los miembros del personal poseerán y tendrán la obligación de utilizar el equipo de protección individual, adaptándolo a las tareas a realizar, suministrado por el promotor, como responsable del ámbito de seguridad y salud. Este incluirá:

- Protectores auditivos.
- Mascarillas autofiltrantes de la clase FFP3.
- Bata de laboratorio de manga larga sin puño.
- Guantes de látex protección microorganismos.
- Botas de seguridad.
- Pantalón impermeable de alta visibilidad.
- Gafas montura universal.
- Casco de seguridad ABS o PEAD.
- Ropa de trabajo: Camisa manga larga.

Los elementos que componen el equipo de protección individual deberán estar correctamente homologados por el Ministerio de Trabajo, Migraciones y Seguridad Social.

4.3.4 Señalización

En aquellos lugares en los que se lleve a cabo el almacenaje y conservación de sustancias químicas y/o sustancias potencialmente dañinas para la salud, se instalarán adhesivos que adviertan de estos peligros. De la misma forma se colocarán adhesivos de alerta en las zonas en las que haya riesgos de caídas, golpes y cortes.

5. MEDICIONES

5.1 EPÍGRAFE. I. MEDIDAS GENERALES

Uds.	Descripción	Subtotal (unidad)	Medición (unidad)
Uds.	Botiquín de urgencias	1	1
Uds.	Reconocimiento médico obligatorio	4	4

5.2 EPÍGRAFE. II. PROTECCIÓN CONTRA INCENDIOS

Uds.	Descripción	Subtotal (unidad)	Medición (unidad)
Uds.	Extintor de nieve carbónica CO ₂ , 2 kg.	3	3
Uds.	Bloque alumbrado de emergencia IP65-8W	1	1

5.3 EPÍGRAFE. III. PROTECCIÓN PERSONAL

Uds.	Descripción	Subtotal (unidad)	Medición (unidad)
Uds.	Protectores auditivos tapones con cordón	4	4
Uds.	Mascarillas autofiltrantes de la clase FFP3, de un solo uso.	50	50
Uds.	Bata de laboratorio de manga larga sin puño	4	4
Caja	Guantes de látex protección microorganismos	1	1
Pares	Botas altas de seguridad en PVC; sin puntera ni plantilla de seguridad; suela antideslizante con resaltes.	4	4
Uds.	Pantalón impermeable de alta visibilidad, con cinturilla elástica, resistente a la penetración de agua y vapor	4	4
Uds.	Gafas montura universal	4	4
Uds.	Casco de seguridad ABS o PEAD,	4	4
Uds.	Ropa de trabajo: Camisa manga larga	4	4

5.4 EPÍGRAFE. IV. SEÑALIZACIÓN

Uds.	Descripción	Subtotal (unidad)	Medición (unidad)
Uds.	Cartel indicativo riesgo sin soporte	8	8

6. ÍNDICE DE PRECIOS

Descripción	Precio unitario
Botiquín de urgencias	53,36
Reconocimiento médico obligatorio	59,25
Extintor de nieve carbónica CO ₂ , 2 kg.	99,63
Bloque alumbrado de emergencia IP65-8W	161,97
Protectores auditivos tapones con cordón	0,22
Mascarillas autofiltrantes de la clase FFP3, de un solo uso.	1,15
Bata de laboratorio de manga larga sin puño	13,94
Guantes de látex protección microorganismos	2,88
Botas altas de seguridad en PVC; sin puntera ni plantilla de seguridad; suela antideslizante con resaltes.	4,73
Pantalón impermeable de alta visibilidad, con cinturilla elástica, resistente a la penetración de agua y vapor	7,43
Gafas montura universal	6,45
Casco de seguridad ABS o PEAD,	7,89
Ropa de trabajo: Camisa manga larga	8,34
Cartel indicativo riesgo sin soporte	3,57

7. PRESUPUESTOS: PARCIALES**7.1 MEDIDAS GENERALES**

Descripción	Uds.	Precio unitario (€/unidad)	Precio final (€)
Botiquín de urgencias	1	53,36	53,36
Reconocimiento médico	4	59,25	237,00
Total			290,36

7.2 PROTECCIÓN CONTRA INCENDIOS

Descripción	Uds.	Precio unitario (€/unidad)	Precio final (€)
Extintor de nieve carbónica CO ₂ , 2 kg.	3	99,63	298,89
Bloque alumbrado de emergencia IP65-8W	1	161,97	161,97
Total			460,86

7.3 PROTECCIÓN PERSONAL

Descripción	Uds.	Precio unitario (€/unidad)	Precio final (€)
Protectores auditivos tapones con cordón	4	0,22	0,88
Mascarillas autofiltrantes de la clase FFP3, de un solo uso.	50	1,15	57,50

ANEJO VIII: ESTUDIO BÁSICO DE SEGURIDAD Y SALUD

Bata de laboratorio de manga larga sin puño	4	13,94	55,76
Guantes de látex protección microorganismos	1	2,88	2,88
Botas altas de seguridad en PVC; sin puntera ni plantilla de seguridad; suela antideslizante con resaltes	4	4,73	18,92
Pantalón impermeable de alta visibilidad, con cinturilla elástica, resistente a la penetración de agua y vapor	4	7,43	29,72
Gafas montura universal	4	6,45	25,80
Casco de seguridad ABS o PEAD,	4	7,89	31,56
Ropa de trabajo: Camisa manga larga	4	8,34	33,36
Total			256,38

7.4 SEÑALIZACIÓN

Descripción	Uds.	Precio unitario (€/unidad)	Precio final (€)
Cartel indicativo riesgo sin soporte	8	3,57	28,56
Total			28,56

8. PRESUPUESTOS: RESUMEN

- EPÍGRAFE. I: 290,36
- EPÍGRAFE. II: 460,86
- EPÍGRAFE. III: 256,38
- EPÍGRAFE. IV: 28,56

TOTAL: 1036,16€

En cuanto a materia de seguridad y salud en el trabajo, el presupuesto de puesta en marcha del proyecto “Proyecto de diseño de una línea de producción de hongos y bacterias micorrízicos para la mejora de suelos forestales”, asciende a MIL TREINTA Y SEIS EUROS Y DIECISEIS CÉNTIMOS.

ANEJO IX: PLAN DE VIABILIDAD Y COMPETENCIA

Índice del Anejo IX

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ESTUDIO DE LA COMPETENCIA	1
2.2 INGRESOS	1
2.2 GASTOS	2
2.3 FINANCIACIÓN	6
2.4 FLUJOS DE CAJA	7
2.5 RENTABILIDAD DEL PROYECTO	7
3. ESTUDIO DE MERCADO	9
3.1 MERCADO GLOBAL, EUROPEO Y NACIONAL	9
3.2 PREVISIONES DE FUTURO	10

1. INTRODUCCIÓN

La viabilidad económica de un producto está determinada por características propias, como su precio, calidad o rendimiento, pero también por factores externos como el nivel de oferta y la demanda global, presente y futura. Debido a que la viabilidad económica es un factor esencial para llevar a cabo un proyecto, se va a llevar a cabo el estudio económico actual del proyecto, pero también un análisis del escenario futuro más probable.

2. ESTUDIO ECONÓMICO

El estudio económico, que determina la viabilidad económica actual y en un futuro cercano del proyecto, se basa en el balance de los ingresos obtenidos de la actividad realizada y de los costes generados por la misma. De esta forma y para garantizar la viabilidad del proyecto se pretenderá obtener un balance positivo al final del periodo de explotación, el cual, en el caso del presente proyecto, se fija en 15 años. Se ha fijado este periodo de tiempo al considerarse que, tras 15 años de uso, los equipos utilizados deberían ser sustituidos debido al desgaste y pérdida de rendimiento. Tras la finalización de este periodo de explotación se considerará la renovación de los equipos dependiendo de los resultados económicos obtenidos.

2.1 INGRESOS

La principal fuente de ingresos del presente proyecto es la venta, como biofertilizantes, de *T. harzianum*, *T. atroviride*, *P. fluorescens* y *P. putida* tras su producción y formulación. Sin embargo, también se prevén ingresos puntuales obtenidos de la venta de aquellos equipos y materiales que, debido a su uso, hayan perdido las cualidades requeridas para la consecución de la actividad.

En el anejo VI de este mismo proyecto, centrado en el diseño de los tratamientos y la organización del proceso productivo, se ha determinado el precio de cada producto una vez formulado y envasado, de forma que los ingresos que se esperan cada año con la producción proyectada ascienden a 438937,08 €. Dentro de los ingresos periódicos también se va a incluir la venta anual de las garrafas de polietileno autoclavables por el 5 % de su valor inicial. Esto se debe al desgaste y pérdida de propiedades que sufren en cada proceso de autoclavado.

Los ingresos puntuales se prevén en aquellos materiales y equipos más susceptibles a perder sus características por el uso continuado. Estos son:

- Fregaderos de elaboración de medios de cultivo y soluciones crio-protectoras. Se sustituirán cada ocho años.
- Bandejas de liofilización a granel Teclen® Lyoprotect® LPMU-V2740B-WS. Se sustituirán cada tres años
- Carros de servicio de acero inoxidable. Se sustituirán cada ocho años.

Las cuantías obtenidas por la venta de estos equipos variarán según el estado final de estos, calculándose como un 10 % del precio inicial en el caso de los fregaderos y los carros, y como un 5 % del precio inicial en el caso de las bandejas. Esta diferencia se

ANEJO IX: PLAN DE VIABILIDAD Y COMPETENCIA

debe al mayor desgaste y pérdida de características producidos en las bandejas y garrafas, al estar sometidos a peores condiciones.

Las cuantías de los ingresos esperados cada año, tanto los ingresos periódicos, como los puntuales, se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1: Relación de ingresos a lo largo de la vida del proyecto. (Expresado en euros)

Año	Ingresos periódicos		Ingresos puntuales			Ingresos totales
	Ventas	Garrafas	Fregadero	Bandejas	Carros	
0	-	-	-	-	-	293278,17
1	438937,08	52,55	-	-	-	438989,63
2	438937,08	52,55	-	-	-	438989,63
3	438937,08	52,55	-	289,22	-	439278,85
4	438937,08	52,55	-	-	-	438989,63
5	438937,08	52,55	-	-	-	438989,63
6	438937,08	52,55	-	289,22	-	439278,85
7	438937,08	52,55	-	-	-	438989,63
8	438937,08	52,55	114,77	-	42,57	439146,97
9	438937,08	52,55	-	289,22	-	439278,85
10	438937,08	52,55	-	-	-	438989,63
11	438937,08	52,55	-	-	-	438989,63
12	438937,08	52,55	-	289,22	-	439278,85
13	438937,08	52,55	-	-	-	438989,63
14	438937,08	52,55	-	-	-	438989,63
15	438937,08	52,55	-	289,22	-	439278,85

2.2 GASTOS

Los gastos, al igual que en el caso anterior, se van a agrupar según sean periódicos o puntuales. Los gastos periódicos están constituidos por:

- Los costes de producción.
- Los costes de la mano de obra.
- Seguros de equipos (1,5 % de su valor inicial).
- Seguro de la instalación (1,5 % de su valor inicial).
- Nuevas adquisiciones de materiales (garrafas esterilizables).

ANEJO IX: PLAN DE VIABILIDAD Y COMPETENCIA

-Reposición de los elementos de los equipos de protección individual que deben ser renovados frecuentemente (protectores auditivos, guantes de látex y mascarillas de protección).

Por su parte, los gastos puntuales se componen de:

-Mantenimiento de los equipos, llevado a cabo cada cuatro años (10 % de su valor inicial).

-Mantenimiento de las instalaciones (10 % de su valor inicial).

-Adquisición de nuevos materiales. (fregaderos, carros y bandejas)

-Reposición del resto de los elementos de los equipos de protección individual (Botas, uniformes, cascos, gafas,)

-Mantenimiento de los elementos de seguridad y salud (extintores)

Las cuantías de los gastos se encuentran recogidas en la Tabla 2 y la Tabla 3.

Tabla 2: Relación de gastos periódicos a lo largo de la vida del proyecto. (Expresado en euros)

Año	Gastos periódicos						Gastos totales
	Coste producción	Mano de obra	Seguro equipos	Seguro instalaciones	Garrapas esterilizables	Reposición EPIS	
0	-	-	-	-	-	-	0
1	101287,32	245714,88	5861,28	300	1051,05	731,60	354946,13
2	101287,32	245714,88	5861,28	300	1051,05	731,60	354946,13
3	101287,32	245714,88	5861,28	300	1051,05	731,60	354946,13
4	101287,32	245714,88	5861,28	300	1051,05	731,60	354946,13
5	101287,32	245714,88	5861,28	300	1051,05	731,60	354946,13
6	101287,32	245714,88	5861,28	300	1051,05	731,60	354946,13
7	101287,32	245714,88	5861,28	300	1051,05	731,60	354946,13
8	101287,32	245714,88	5861,28	300	1051,05	731,60	354946,13
9	101287,32	245714,88	5861,28	300	1051,05	731,60	354946,13
10	101287,32	245714,88	5861,28	300	1051,05	731,60	354946,13
11	101287,32	245714,88	5861,28	300	1051,05	731,60	354946,13
12	101287,32	245714,88	5861,28	300	1051,05	731,60	354946,13
13	101287,32	245714,88	5861,28	300	1051,05	731,60	354946,13
14	101287,32	245714,88	5861,28	300	1051,05	731,60	354946,13
15	101287,32	245714,88	5861,28	300	1051,05	731,60	354946,13

Alumno: Rodrigo Herrera Sanz
 UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (CAMPUS DE PALENCIA). E.T.S. de Ingenierías Agrarias
 Titulación: Grado en Ingeniería Forestal y del Medio Natural

Tabla 3: Relación de gastos puntuales a lo largo de la vida del proyecto. (Expresado en euros)

Año	Gastos puntuales									Gastos totales
	Inversión inicial	Pago crédito	Mant. equipos	Mant. instalaciones	Reposición EPIS	Reposición fregaderos	Reposición bandejas	Reposición carros	Mant. extintores	
0	404666,05	-	-	-	-	-	-	-	-	404666,05
1	-	44191,71	-	-	-	-	-	-	-	44191,71
2	-	44191,71	-	-	780,48	-	-	-	-	44972,19
3	-	44191,71	-	-	-	-	5784,48	-	-	49976,19
4	-	44191,71	39075,18	-	780,48	-	-	-	-	84047,37
5	-	44191,71	-	-	-	-	-	-	44,83	44236,54
6	-	44191,71	-	-	780,48	-	5784,48	-	-	50756,67
7	-	44191,71	-	2000	-	-	-	-	-	46191,71
8	-	44191,71	39075,18	-	780,48	1147,72	-	425,72	-	85620,81
9	-	-	-	-	-	-	5784,48	-	-	5784,48
10	-	-	-	-	780,48	-	-	-	44,83	825,31
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	39075,18	-	780,48	-	5784,48	-	-	45640,14
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	780,48	-	-	-	-	780,48
15	-	-	-	-	-	-	5784,48	-	44,83	5829,31

Alumno: Rodrigo Herrera Sanz
 UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (CAMPUS DE PALENCIA). E.T.S. de Ingenierías Agrarias
 Titulación: Grado en Ingeniería Forestal y del Medio Natural

ANEJO IX: PLAN DE VIABILIDAD Y COMPETENCIA

A los gastos periódicos y puntuales, hay que sumar la inversión inicial para la formación de la línea productiva y la adquisición de la nave en la que se llevará a cabo el proyecto. Esta inversión inicial asciende a 404172,67 € para la conformación de la línea de producción y a 493,38 € para la adquisición de los materiales y equipos de seguridad.

2.3 FINANCIACIÓN

Debido a la naturaleza y características del proyecto se necesita llevar a cabo una fuerte inversión inicial en pago único que permita adquirir todos los elementos de la línea de producción y comenzar la fase de explotación. Para ello, se van a buscar distintas fuentes de financiación, en forma de subvenciones y créditos que permitan la puesta en marcha del proyecto.

Se han analizado las subvenciones y ayudas financieras ofertadas por las distintas administraciones competentes, a nivel provincial, regional, nacional y continental, a las que el presente proyecto pudiera adherirse debido a sus características y cualidades. Sin embargo, no se han encontrado ayudas, dentro del plazo de ejecución del proyecto, a las que se pueda optar. Por ello, se va a recurrir a la financiación a través de créditos bancarios. Se va a solicitar un crédito bancario al Instituto de Crédito Oficial (ICO) que, en su línea de crédito a empresas y emprendedores, ofrece condiciones e intereses aceptables. De esta forma se solicitará un crédito por una cantidad de 293278,17 €, capital suficiente para cubrir el 72,5 % de la inversión, mientras que el promotor deberá cubrir el 27,5 % restante (111387,88 €). Este crédito será concedido a devolver en 8 años, sin carencia y con un interés fijo del 4,346 % (Datos oficiales entre el 15 y el 30 de mayo de 2020).

El análisis del crédito se ha llevado a cabo con la herramienta de Excel Valproin, en el que se han obtenido los valores que se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4: Condiciones del crédito solicitado

FINANCIACIÓN AJENA	
Subvenciones	-
Préstamo (Anual. Cte.)	293.278,17
Plazo (Máx. 20 años)	8
Coste	4,35
Años de carencia	-
Anualidades préstamo	
1	44.191,71
2	44.191,71
3	44.191,71
4	44.191,71
5	44.191,71
6	44.191,71
7	44.191,71
8	44.191,71

2.4 FLUJOS DE CAJA

La relación entre los cobros y los gastos anuales, conocida como flujos de caja, se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5: Flujos de caja (Expresado en euros)

Año	Ingresos periódicos	Ingresos puntuales	Gastos periódicos	Gastos puntuales	TOTAL (€)
0	-	293278,17	-	404666,05	-111387,88
1	438989,63	-	354946,13	44191,71	39851,79
2	438989,63	-	354946,13	44972,19	39071,31
3	438989,63	289,22	354946,13	49976,19	34356,53
4	438989,63	-	354946,13	84047,37	-3,87
5	438989,63	-	354946,13	44236,54	39806,96
6	438989,63	289,22	354946,13	50756,67	33576,05
7	438989,63	-	354946,13	46191,71	37851,79
8	438989,63	157,34	354946,13	85620,81	-1419,97
9	438989,63	289,22	354946,13	5784,48	78548,24
10	438989,63	-	354946,13	825,31	83218,19
11	438989,63	-	354946,13	-	84043,50
12	438989,63	289,22	354946,13	45640,14	38692,58
13	438989,63	-	354946,13	-	84043,50
14	438989,63	-	354946,13	780,48	83263,02
15	438989,63	289,22	354946,13	5829,31	78503,41

2.5 RENTABILIDAD DEL PROYECTO

Para determinar si el proyecto es económicamente rentable, se va a realizar el cálculo del Valor Actual Neto (VAN), Pay-back y la relación Beneficio-Coste.

Para el cálculo del VAN se va a utilizar la siguiente fórmula:

$$VAN = R_1/(1 + r) + R_2/(1 + r)^2 + \dots + R_n/(1 + r)^n - K$$

Donde:

-R: Flujos de caja de cada año en actividad (Expresado en unidades monetarias)

-r: Tasa de actualización. Se utilizará un valor del 5 %.

-K: Pago de la inversión (Expresado en unidades monetarias)

Tras realizar el cálculo se obtiene un resultado de 370648 que, al ser mayor que cero, indica que el proyecto, en las condiciones actuales es rentable.

-El Pay-back es el índice que aporta información sobre el tiempo requerido para recuperar la inversión inicial, de forma que se puede considerar como un indicador del momento en el que el proyecto comenzará a aportar beneficios. Para su cálculo se seguirá la siguiente expresión:

$$Pb = K + R_1 + R_2 + \dots + R_n = 0$$

Donde:

-Pb: Pay-back

-K: La inversión inicial (Expresada en unidades monetarias)

-R: Flujos de caja de cada año seleccionado. (Expresado en unidades monetarias)

Los resultados obtenidos indican que, para el presente proyecto, el periodo de Pay-back se sitúa en tres (3) años; de forma que, tras tres años de explotación, la línea de producción comenzará a aportar beneficios.

-La relación Beneficio-Coste muestra la relación actualizada entre los ingresos y los gastos presentes y futuros. El resultado final plantea tres escenarios:

- $B/C < 1$: En el caso en el que la relación Beneficio/Coste sea menor que 1, se considera que la inversión inicial no se recupera durante el periodo de vida útil del proyecto, de forma que no es rentable.
- $B/C = 1$: en el caso en el que la relación Beneficio/Coste sea igual que 1, se considera que la inversión inicial se recupera durante la vida útil del proyecto, pero este no aporta ningún beneficio.
- $B/C > 1$: En el caso en el que la relación Beneficio/Coste sea mayor que 1, se considera que la inversión inicial se recupera durante la vida útil del proyecto y, además, este aporta beneficios.

Para su cálculo se utilizará las siguientes expresiones:

$$I_a = I_n / (1+r)^n$$

$$C_a = C_n / (1+r)^n$$

$$B/C = (\sum I_a) / (\sum C_a)$$

Donde:

-r: Interés utilizado para el cálculo de la tasa de actualización (establecido en un 5 %)

- I_n : Representa los ingresos de un año "n" (siendo "n" cualquier año de la vida útil del proyecto)

- C_n : Representa los costes de un año "n" (siendo "n" cualquier año de la vida útil del proyecto)

- I_a : Representa los ingresos actualizados de un año "n" (siendo "n" cualquier año de la vida útil del proyecto)

- C_a : Representa los costes actualizados de un año "n" (siendo "n" cualquier año de la vida útil del proyecto)

El resultado obtenido tras el cálculo de la relación de Beneficio/Coste es de 1,08, lo que indica que con la explotación del proyecto se recuperará la inversión y se obtendrán beneficios, haciendo de este un proyecto rentable.

3. ESTUDIO DE MERCADO

La viabilidad económica de cualquier nuevo proyecto está determinada por factores como la calidad del producto o servicio que suministra, su precio, la competencia, y la demanda del mercado. De ellos únicamente dos, la calidad y el precio del producto, son controlables por el productor, mientras que el resto depende de las circunstancias económicas globales. Es por ello por lo que el análisis de la situación actual y las previsiones futuras del mercado adquiere gran importancia.

3.1 MERCADO GLOBAL, EUROPEO Y NACIONAL

Actualmente el mercado de los denominados biofertilizantes se encuentra en una situación positiva, presentando un crecimiento sostenido durante la última década hasta alcanzar un valor de entre 1,45 y 1,66 mil millones de euros.

Los principales mercados globales se encuentran en Norteamérica y en Europa, siendo los Estados Unidos el país con el mercado de biofertilizantes más potente. Esto se debe a que durante los últimos años la demanda de productos orgánicos se ha disparado y, por tanto, la demanda de componentes naturales para el tratamiento de plagas y enfermedades y suministro de nutrientes, ha seguido el mismo camino.

Actualmente, Europa constituye el segundo mercado mundial de estos productos, con una cuota de mercado del 15,28 % en el año 2019. Este presenta un crecimiento regular y sostenido, impulsado por la, cada vez, mayor demanda de productos orgánicos y certificados, pero también por la nueva legislación europea, cada vez más restrictiva con respecto a los nutrientes y pesticidas químicos. Dentro de Europa, España es el principal productor de productos orgánicos, suministrando este tipo de productos a países del centro y norte de Europa, lo que hace que la demanda de biofertilizantes sea alta, principalmente para su uso en la agricultura, pero también en el sector forestal.

3.2 PREVISIONES DE FUTURO

Debido a que se espera que las tendencias que impulsan el crecimiento del mercado de los biofertilizantes se mantengan e incluso se intensifiquen durante los próximos años, las previsiones de crecimiento del mercado de los biofertilizantes son muy positivas.

ANEJO IX: PLAN DE VIABILIDAD Y COMPETENCIA

Se espera un crecimiento interanual del mercado global de entre un 10,1 y un 11,3 %, alcanzando un valor total de entre 2,58 y 2,91 mil millones de euros para el año 2026, lo que significa que, para ese año, el valor del mercado será casi del doble, comparado con 2019.

Estas previsiones, unidas a la posición de España en el mercado europeo y a las, cada vez más restrictivas medidas de la Unión europea respecto a los compuestos y químicos utilizados y aplicados en el medioambiente, hacen que las previsiones económicas del presente proyecto para el próximo lustro sean positivas.

ANEJO X: JUSTIFICACIÓN DE PRECIOS

Índice del Anejo X

CUADRO DE PRECIOS DE LA MAQUINARIA	1
CUADRO DE PRECIOS DE LOS MATERIALES	1
CUADRO DE PRECIOS DE LA MANO DE OBRA	3
CUADRO DE PRECIOS DE LAS UNIDADES DE OBRA	3
CAPÍTULO. I. TRABAJOS PREVIOS	3
EPÍGRAFE 1.1: Identificación genética	3
EPÍGRAFE 1.2: PRUEBA PRODUCCIÓN EN SÓLIDO <i>TRICHODERMA SPP.</i>	5
CAPÍTULO. II. LÍNEA DE PRODUCCIÓN	8
EPÍGRAFE 2.1: FASE I	8
EPÍGRAFE 2.2: FASE II	9
EPÍGRAFE 2.3: FASE III	9
EPÍGRAFE 2.4: OTROS	10
CAPÍTULO. III. SEGURIDAD Y SALUD	11
EPÍGRAFE 3.1: SEGURIDAD	11
EPÍGRAFE 3.2: SALUD	13

CUADRO DE PRECIOS DE LA MAQUINARIA

Núm.	Descripción	Precio (€)
1	PCR Thermo cycler	0,56
2	Microscopio óptico	0,45
3	Campana de gases de laboratorio	0,19
4	Selladora con levantamiento automático	0,08
5	Cubeta de electroforesis y fuente de alimentación eléctrica	0,07
6	Cubeta de electroforesis	0,07
7	Centrifugadora angular	0,05
8	Balanza de laboratorio	0,02

CUADRO DE PRECIOS DE LOS MATERIALES

Núm.	Descripción	Precio (€)
1	Biorreactor Bionet F3 MB de 100 litros.	150610,000
2	Biorreactor Bionet F2 MB-30	92690,000
3	Autoclave/esterilizador Celitron Azteca A-456 de alta capacidad	50665,560
4	Liofilizador Kemolo FD-50	49991,940
5	Biorreactor Bionet F1 MB-3	30890,000
6	Caseta modular multiusos de interior. 3,28 m (L) x 3 m (An)	5300,000
7	Cámara frigorífica Impafri	4178,020
8	Fregadero industrial de gran capacidad en acero inoxidable	553,880
9	Carro de servicio en acero inoxidable AISI 304.	206,660
10	Bandeja de liofilización Teclen® Lyoprotect® LPMU-V2740B-WS para liofilización a granel.	160,680

ANEJO X: JUSTIFICACIÓN DE PRECIOS

11	Bloque alumbrado de emergencia incandescente decorativo IP65 – 8w.	157,250
12	Mesa de madera con capacidad para 10 personas	111,890
13	Extintor portátil de nieve carbónica CO ₂ (2 kg)	94,550
14	Taquilla metálica individual	77,130
15	Garrafas Thermo Scientific™ Nalgene™, de 10 litros.	68,030
16	Botiquín primeros auxilios	51,810
17	Banco de madera capacidad para 5 personas	45,550
18	Arroz integral	4,380
19	Cartel indicativo de riesgo	3,570
20	Agarosa	2,660
21	Kit de extracción E.Z.N.A.®Plant DNA Kit con 200 preparaciones equipado con HiBind®DNA Mini Columna y mezclas tampón. Extracción rápida, fiable y de alta calidad del ADN celular.	2,300
22	Kit de amplificación ilustra PuReTaq Ready-To-Go PCR Beads de 96 preparaciones.	1,800
23	Bolsa de muestreo estéril gran formato	1,240
24	<i>Ladder</i> 100bp DNA	0,990
25	Patata Dextrosa Caldo (PDB). 250g	0,560
26	<i>Primer</i> 16SF	0,360
27	<i>Primer</i> 16SR	0,360
28	Patata Dextrosa Agar (PDA). 250g	0,340
29	Trigo integral	0,230
30	Cebada integral	0,210
31	<i>Primer</i> ITS 4	0,210
32	<i>Primer</i> ITS 1	0,210
33	Tubos Eppendorf 5ml estériles	0,200

ANEJO X: JUSTIFICACIÓN DE PRECIOS

34	Centeno integral	0,190
35	Colorante de ADN "Midori green"	0,090
36	<i>Loading buffer</i>	0,005
37	TAE 10X <i>buffer</i>	0,004

CUADRO DE PRECIOS DE LA MANO DE OBRA

Núm.	Descripción	Precio (€)
1	Oficial instalador	25,60
2	Peón instalador	21,82
3	Director de laboratorio	20,06
4	Técnico de laboratorio	17,72

CUADRO DE PRECIOS DE LAS UNIDADES DE OBRA**CAPÍTULO.I. TRABAJOS PREVIOS****EPIGRAFE 1.1: IDENTIFICACIÓN GENÉTICA**

Orden	Ud	Descripción	Importe
1.1.1	Prep	Proceso de extracción del material genético (ADN) de las muestras número uno y dos, siguiendo el protocolo indicado por kits específicos.	
	2,00 prep.	Kit de extracción E.Z.N.A.®Plant DNA Kit con 200 preparaciones equipado con HiBind®DNA Mini Column y mezclas tampón. Extracción rápida, fiable y de alta calidad del ADN celular.	2,30 4,60
	4,00 ud	Tubos Eppendorf 5 ml estériles.	0,20 0,80
	1,50 h	Centrifugadora angular	0,05 0,08
	1,50 h	Técnico laboratorio	17,72 26,58
%CD	3,00%	Medios auxiliares	32,06 0,96
	3,00%	Costes indirectos	33,02 0,99
Precio total por preparación			34,01

ANEJO X: JUSTIFICACIÓN DE PRECIOS

		Proceso de amplificación del ADN de las muestras uno y dos, mediante la realización de PCR.			
1.1.2	Pre	2,00 ud.	Kit de amplificación ilustra PuReTaq Ready-To-Go PCR Beads de 96 preparaciones.	1,80	3,60
		5 µl	<i>Primer ITS4</i>	0,21	1,05
		5 µl	<i>Primer ITS1</i>	0,21	1,05
		3,50 h	Técnico de laboratorio	17,72	62,02
		3,50 h	PCR Thermo cycler	0,56	1,96
%CD		3,00%	Medios auxiliares	69,68	2,09
		3,00%	Costes indirectos	71,77	2,15
Precio total por preparación					73,94
		Proceso de amplificación del ADN de las muestras tres y cuatro, mediante la realización de PCR.			
1.1.3	Pre	2,00 ud.	Kit de amplificación ilustra PuReTaq Ready-To-Go PCR Beads de 96 preparaciones.	1,80	3,60
		6 µl	<i>Primer 16SF</i>	0,36	2,16
		6 µl	<i>Primer 16SR</i>	0,36	2,16
		3,50 h	Técnico de laboratorio	17,72	62,02
		3,50 h	PCR Thermo cycler	0,56	1,96
		3,00%	Medios auxiliares	71,90	2,16
		3,00%	Costes indirectos	74,06	2,22
Precio total por preparación					76,28
1.1.4	Pre	Consecución de la técnica molecular de electroforesis para la confirmación y evaluación de la amplificación del ADN de las cuatro muestras.			
		1,50 g	Agarosa	2,66	3,99

ANEJO X: JUSTIFICACIÓN DE PRECIOS

	15,00 µl	Colorante de ADN Midori green	0,09	1,35
	25,00 ml	TAE <i>buffer</i> 10X	0,04	1,10
	8,00 µl	<i>Loading buffer</i>	0,00	0,05
	5,00 µl	<i>Ladder</i> 100bp DNA	0,99	4,96
	1,50 h	Técnico de laboratorio	17,72	26,58
	0,25 h	Director de laboratorio	20,06	5,02
	0,50 h	Cubeta de electroforesis y fuente de alimentación	0,07	0,04
%CD	3,00%	Medios auxiliares	43,09	1,29
	3,00%	Costes indirectos	44,38	1,33
Precio total por preparación				45,71
1.1.5	Mue	Secuenciación genética para la identificación del género y especie de una de las muestras de ADN, llevado a cabo por parte de la empresa STAB Vida.		
	1,00 mu	Secuenciación	5,00	5,00
%CD	3,00%	Medios auxiliares	5,00	0,15
	3,00%	Costes indirectos	5,15	0,16
Precio total por muestra				5,31

EPÍGRAFE 1.2: PRUEBA PRODUCCIÓN EN SÓLIDO *TRICHODERMA SPP.*

Orden	Ud	Descripción	Importe
1.2.1	Cul.	Preparación del inóculo en placa Petri, mediante cultivo en medio sólido (PDA) de una muestra de <i>Trichoderma spp.</i>	
	0,60 g	Patata Dextrosa Agar (PDA). 250 g	0,20
	0,25 h	Técnico laboratorio	4,43
	0,25 h	Campana de gases laboratorio	0,05
%CD	3,00%	Medios auxiliares	4,68
	3,00%	Costes indirectos	4,82

Alumno: Rodrigo Herrera Sanz
 UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (CAMPUS DE PALENCIA). E.T.S. de Ingenierías Agrarias
 Titulación: Grado en Ingeniería Forestal y del Medio Natural

		Precio total por cultivo	4,96		
1.2.2	Cul.	Preparación del inóculo en medio líquido (PDB) de una muestra de <i>Trichoderma spp.</i>			
		24,00 g	Patata Dextrosa Caldo (PDB). 250 g	0,56	13,44
		0,25 h	Técnico Laboratorio	17,72	4,43
		0,25 h	Campana de gases laboratorio	0,19	0,05
%CD		1,00%	Medios auxiliares	17,92	0,18
		3,00%	Costes indirectos	18,10	0,54
		Precio total por cultivo	18,64		
1.2.3	Prep.	Preparación del trigo integral para su uso como medio de cultivo en la prueba de producción en estado sólido.			
		2,50 kg	Trigo integral	0,23	0,58
		1,00 ud	Bolsa de muestreo estéril gran formato	1,24	1,24
		0,50 h	Técnico laboratorio	17,72	8,86
		0,15 h	Director de laboratorio	20,06	3,01
		0,50 h	Campana de gases laboratorio	0,19	0,10
		0,50 h	Selladora levantamiento automático	0,08	0,04
%CD		3,00%	Medios auxiliares	13,83	0,42
		3,00%	Costes indirectos	14,25	0,43
		Precio total por preparación	14,68		
1.2.4	Prep.	Preparación del centeno integral para su uso como medio de cultivo en la prueba de producción en estado sólido.			
		2,50 kg	Centeno integral	0,19	0,48
		1,00 ud	Bolsa de muestreo estéril gran formato	1,24	1,24

ANEJO X: JUSTIFICACIÓN DE PRECIOS

	0,50 h	Técnico laboratorio	17,72	8,86
	0,15 h	Director de laboratorio	20,06	3,01
	0,50 h	Campana de gases laboratorio	0,19	0,10
	0,50 h	Selladora automático levantamiento	0,08	0,04
%CD	3,00%	Medios auxiliares	13,73	0,41
	3,00%	Costes indirectos	14,14	0,42
Precio total por preparación			14,56	

1.2.5 Prep. **Preparación de la cebada integral para su uso como medio de cultivo en la prueba de producción en estado sólido.**

	2,50 kg	Cebada integral	0,21	0,51
	1,00 ud	Bolsa de muestreo estéril gran formato	1,24	1,24
	0,50 h	Técnico laboratorio	17,72	8,86
	0,15 h	Director de laboratorio	20,06	3,01
	0,50 h	Campana de gases laboratorio	0,19	0,10
	0,50 h	Selladora automático levantamiento	0,08	0,04
%CD	3,00%	Medios auxiliares	13,76	0,41
	3,00%	Costes indirectos	14,17	0,42
Precio total por preparación			14,59	

1.2.6 Prep. **Preparación del arroz integral para su uso como medio de cultivo en la prueba de producción en estado sólido.**

	2,50 kg	Arroz integral	4,38	10,95
	1,00 ud	Bolsa de muestreo estéril gran formato	1,24	1,24
	0,50 h	Técnico laboratorio	17,72	8,86
	0,15 h	Director de laboratorio	20,06	3,01

ANEJO X: JUSTIFICACIÓN DE PRECIOS

	0,50 h	Campana de gases laboratorio	0,19	0,10
	0,50 h	Selladora levantamiento automático	0,08	0,04
%CD	3,00%	Medios auxiliares	24,20	0,73
	3,00%	Costes indirectos	24,93	0,75
Precio total por preparación				25,68
1.2.7	Med.	Medición del número de unidades formadoras de colonia (UFC) de cada medio utilizado.		
	0,50 h	Técnico laboratorio	17,72	8,86
	0,15 h	Director de laboratorio	20,06	3,01
	0,33 h	Microscopio óptico	0,45	0,15
	0,50 h	Campana de gases laboratorio	0,19	0,10
	0,15 h	Selladora levantamiento automático	0,08	0,01
	0,50 h	Balanza laboratorio	0,02	0,01
%CD	3,00%	Medios auxiliares	12,14	0,36
	3,00%	Costes indirectos	12,50	0,38
Precio total por medición				12,88

CAPÍTULO. II. LÍNEA DE PRODUCCIÓN

EPÍGRAFE 2.1: FASE I

Orden	Ud.	Descripción	Importe	
2.1.1	Ud.	Sistema autoclave/esterilizador modelo Celitron Azteca A-456 de alta capacidad. Incluye la entrega, instalación y formación de personal.		
	1 ud.	Autoclave/esterilizador Celitron Azteca A-456 de alta capacidad	50665,56	50665,56
	3,00%	Costes indirectos	50665,56	1519,97
Precio total por unidad				52185,53

ANEJO X: JUSTIFICACIÓN DE PRECIOS

2.1.2	Ud.	Sistema de biofermentación Bionet F1 MB de 3 litros. Incluye el embalaje, transporte, instalación y formación de personal.		
	1 ud.	Biorreactor Bionet F1 MB-3	30890,00	30890,00
	3,00%	Costes indirectos	30890,00	926,70
Precio total por unidad			31816,70	

2.1.3	Ud.	Fregadero industrial de acero inoxidable AISI 304 18/10, de 700 mm de fondo, equipado con una cuba de dimensiones 860 x 500 x 380 mm y una capacidad de 163,4 litros. Incluye el envío a las instalaciones del cliente.		
	1 ud.	Fregadero industrial de gran capacidad en acero inoxidable	553,88	553,88
	0,15 h	Peón	21,82	3,27
	3,00%	Costes indirectos	557,15	16,71
Precio total			573,86	

EPÍGRAFE 2.2: FASE II

Orden	Ud.	Descripción	Importe	
2.2.1	Ud.	Sistema de biofermentación Bionet F2 MB de 30 litros. Incluye el embalaje, transporte, instalación y formación del personal.		
	1 ud.	Biorreactor Bionet F2 MB-30	92690,00	92690,00
	3,00%	Costes indirectos	92690,00	2780,70
Precio total			95470,70	

2.2.2	Ud.	Sistema de biofermentación Bionet F3 MB de 100 litros. Incluye el embalaje, transporte, instalación y formación del personal.		
	1 ud.	Biorreactor Bionet F3 MB-100	150610,00	150610,00
	3,00%	Costes indirectos	150610,00	4518,30
Precio total			155128,30	

EPÍGRAFE 2.3: FASE III

Orden	Ud.	Descripción	Importe
2.3.1	Ud.	Sistema de liofilización Kemolo FD-50. Incluye el transporte, instalación, puesta en marcha y prueba del equipo en las instalaciones del cliente.	
	1 ud.	Sistema de liofilización Kmeolo FD-50	49991,94
	3,00%	Costes indirectos	49991,94
		Precio total	51491,70
2.3.2	Ud.	Bandeja de liofilización Teclen® Lyoprotect® LPMU-V2740B-WS para liofilización a granel.	
	1 ud.	Bandejas Teclen® Lyoprotect® LPMU-V2740B-WS de 1,8 l.	148,00
	1 ud.	Juntas de bandeja LPMU-V1622-FD.	8,00
	3,00%	Costes indirectos	156,00
		Precio total	160,68
2.3.3	Ud.	Sistema de refrigeración con cámara frigorífica (0°-6°C) Impafri de dimensiones 1,76 (L) x 1,36 (F) x 2,28 (A) metros, con un espesor de panel de 80 mm, sin suelo y equipada con una estantería de cuatro niveles y dimensiones 1,60 (L) x 0,37 (F) x 1,67 (A) metros. Incluye el transporte.	
	1 ud.	Cámara frigorífica Impafri	4178,02
	3,00%	Costes indirectos	4178,02
		Precio total	4658,84

EPÍGRAFE 2.4: OTROS

Orden	Ud.	Descripción	Importe
2.4.1	Ud.	Garrafas de polipropileno de 10 litros esterilizables en autoclave Thermo Scientific™ Nalgene™, de 39 cm de altura y 22,5 cm de diámetro exterior. Incluye el envío.	

ANEJO X: JUSTIFICACIÓN DE PRECIOS

	1 ud.	Garrafas Thermo Scientific™ Nalgene™, de 10 litros.	68,03	68,03
	3,00 %	Costes indirectos	68,03	2,04
		Precio total		70,07
2.4.2	Ud.	Carro de servicio en acero inoxidable AISI 304, de dos niveles y capacidad de carga de 100 kg y medidas 890 (L) x 590 (F) x 950 (A) mm.		
	1 ud.	Carro de servicio en acero inoxidable AISI 304.	206,66	206,66
	3,00 %	Costes indirectos	206,66	6,20
		Precio total		212,86
2.4.3	Ud.	Contenedor de basuras de 770 litros de capacidad, con tapa plana. Equipado con ruedas y frenos. Envío gratuito.		
	1 ud.	Contenedor de basura de 770 l con tapa plana, ruedas y frenos.	220,00	220,00
	3,00 %	Costes indirectos	220,00	6,60
		Precio total		226,60
2.4.4	Ud.	Taquilla metálica individual, para uso individual con llave, colocada		
	1 ud.	Taquilla metálica individual	77,13	
	3,00 %	Costes indirectos	2,31	
		Precio total		79,44
2.4.5	Ud.	Banco de madera capacidad para 5 personas		
	1 ud.	Banco de madera	45,55	
	3,00 %	Costes indirectos	1,37	
		Precio total		46,92

ANEJO X: JUSTIFICACIÓN DE PRECIOS

2.4.6	Ud.	Adquisición (instalación incluida) de caseta multiusos, paneles de relleno con esquinas redondeadas. 3,28 m (L) x 3 m (An)		
	1 ud.	Caseta modular multiusos de interior. 3,28 m (L) x 3 m (An)	5300,00	
	3,00 %	Costes indirectos	159,00	
Precio total				5459,00
2.4.7	Ud.	Mesa de madera con capacidad para 10 personas		
	1 ud.	Mesa de madera con capacidad para 10 personas	108,63	
	3,00 %	Costes indirectos	3,26	
Precio total				111,89

CAPÍTULO. III. SEGURIDAD Y SALUD**EPÍGRAFE 3.1 SEGURIDAD**

Orden	Ud.	Descripción	Importe	
3.1.1	Ud.	Extintor portátil de nieve carbónica CO₂, de eficacia 34B, con 2 kg de agente extintor, vaso difusor, según la norma UNE 23110.		
	1 ud.	Extintor portátil de nieve carbónica (2 kg).	94,55	94,55
	0,10 h	Peón instalador	21,82	2,18
	3,00%	Costes indirectos	96,73	2,90
Precio total				99,63
3.1.2	Ud.	Bloque alumbrado de emergencia incandescente decorativo IP65, funcionamiento emergencia-señalización con lámpara de 8 w, autonomía superior a 3 horas, instalado		
	1 ud	Bloque alumbrado IP65 – 8 w	157,25	157,25
	3,00%	Costes indirectos	157,25	4,72

Alumno: Rodrigo Herrera Sanz

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (CAMPUS DE PALENCIA). E.T.S. de Ingenierías Agrarias

Titulación: Grado en Ingeniería Forestal y del Medio Natural

ANEJO X: JUSTIFICACIÓN DE PRECIOS

Precio total	161,97
---------------------	---------------

3.1.3 Ud. **Cartel indicativo de riesgo sin soporte. Colocado.**

1 ud	Cartel indicativo de riesgo	3,47	3,47
3,00 %	Costes indirectos	3,47	0,10

Precio total	3,57
---------------------	-------------

EPÍGRAFE 3.2 SALUD

Orden	Ud	Descripción	Importe
3.2.1	Ud.	Botiquín de primeros auxilios. Contiene lo establecido en el Real Decreto 486/1997	
	1 ud.	Botiquín primeros auxilios	51,81
	3,00%	Costes indirectos	1,55
		Precio total	53,36

ANEJO XI: BIBLIOGRAFÍA

Índice del Anejo XI

1. INTRODUCCIÓN	1
2. BIBLIOGRAFÍA	1
2.1 BIBLIOGRAFÍA ANEJO I: DESCRIPCIÓN DE LOS ORGANISMOS	1
2.2 BIBLIOGRAFÍA ANEJO IV: DISEÑO DE LA LÍNEA PRODUCTIVA	3
2.3 BIBLIOGRAFÍA ANEJO VII: ESTUDIO DE IMPACTO AMBIENTAL	4
2.4 BIBLIOGRAFÍA ANEJO IX: VIABILIDAD Y COMPETENCIA	4

1. INTRODUCCIÓN

La bibliografía es un recurso esencial en la elaboración de estudios y proyectos ingenieriles ya que constituye la base de conocimientos sobre la que se construye todo el trabajo. Su consulta, recopilación y correcta referencia son necesarias si se quiere crear un proyecto de calidad.

Por ello, el presente anejo se centra en la elaboración y organización de la bibliografía utilizada.

2. BIBLIOGRAFÍA

2.1 BIBLIOGRAFÍA ANEJO I: DESCRIPCIÓN DE LOS ORGANISMOS

-A.Q. Rajput, M.A. Khanzada & S. Shahzad. 2014. "Effect of Different Organic Substrates and Carbon and Nitrogen Sources on Growth and Shelf Life of *Trichoderma harzianum*". Journal of Agricultural Science and Technology: 731-742

-E. Donoso, G.A. Lobos & N. Rojas. 2008. "Efecto de *Trichoderma harzianum* y compost sobre el crecimiento de *Pinus radiata* en vivero". BOSQUE: 52-57

-S.A. Nusaibah & H. Musa. 2019. "A Review on the Mechanism of *Trichoderma spp.* as Biological Control Agent of the Basal Stem Rot (BSR) Disease of *Elaeis guineensis*".

-J. Williams et al. 2003. "A Selective Medium for Quantitative Reisolation of *Trichoderma harzianum* from *Agaricus bisporus* Compost". Applied and Environmental Microbiology: 4190-4191.

-J.M. Steyaert et al. 2010. "Reproduction without sex: conidiation in the filamentous fungus *Trichoderma*". Microbiology, 156: 2887-2900.

-N. Carreras-Villaseñor, J.A. Sánchez-Arreguín & A. Herrera-Estrella. 2011. "Trichoderma: Sensing the environment for survival and dispersal". Microbiology, 158: 3-16.

-E. Gamalero & B.R. Glick. "Mechanisms Used by Plant Growth-Promoting Bacteria". Chapter 2. 2011.

-P. Chaverri et al. 2015. "Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the identification of commercial biocontrol strains".

-C.M. Monreal et al. 2014. "Metabolism of n-C_{10:0} and n-C_{11:0} FATTY ACIDS BY *Trichoderma koningii*, *Penicillium janthinellum* and their mixed culture: I. Biomass and CO₂ production, and allocation of intracellular lipids".

-M. Shahid et al. 2014. "Optimal Physical Parameters for Growth of *Trichoderma* species at Varying pH, Temperature and Agitation". Virology and Micology, 3.

-B.C. Rossi-Rodrigues et al. 2009. "Comparative growth of *Trichoderma* strains in different nutritional sources, using bioscreen C automated system". Brazilian Journal of Microbiology, 40: 404-410.

- K. Brunner et al. 2005. "Improvement of the Fungal Biocontrol Agent *Trichoderma atroviride* to Enhance both Antagonism and Induction of Plant Systemic Disease Resistance". *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 3959-3965.
- N. Benhamou & I. Chet. 1996. "Parasitism of Sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*: Ultrastructural and Cytochemical Aspects of the Interaction". *Soil Biology and Biochemistry*, 16: 381-386.
- A. Schuster & M. Schmoll. 2010. "Biology and biotechnology of *Trichoderma*". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87: 787-799.
- L. Soesanto, D.S. Utami & R.F. Rahayuniati. 2011. "Morphological characteristics of four *Trichoderma* isolates and two endophytic *Fusarium* isolates". *Canadian Journal on Scientific and Industrial Research*, 8: 294-306.
- G.E. Harman. Cornell University. "*Trichoderma* spp., including *T. harzianum*, *T. viride*, *T. koningii*, *T. hamatum* and other spp. Deuteromycetes, Moniliales (asexual classification system)".
- G.J. Samuels. 2005. "*Trichoderma*: Systematics, the Sexual State, and Ecology". *Phytopathology*, 96: 195-206
- I. Druzhinina & C.P. Kubicek. 2005. "Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters?". *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 6: 100-120.
- S. Jang et al. 2018. "New Report of Three Unrecorded Species in *Trichoderma harzianum* Species Complex in Korea". *Microbiology*, 46: 177-184.
- G.E. Harman et al. 2004. "TRICHODERMA SPECIES- OPPORTUNISTIC, AVIRULENT PLANT SYMBIONTS". *Nature Reviews Microbiology*, 2: 43-56
- J.F.S. Daniel & E.R. Filho. 2007. "Peptaibols of *Trichoderma*". *Natural Product Reports*, 24: 1128-1141.
- G. Ganeshan & A.M. Kumar. 2007. "*Pseudomonas fluorescens*, a potential bacterial antagonist to control plant diseases". *Journal of Plant Interactions*, 1: 123-134.
- L. Dias dos Anjos Gonçalves et al. 2017. "Predictive modeling of *Pseudomonas fluorescens* growth under different temperature and pH values". *Brazilian Journal of Microbiology*, 48.
- A.E. LaBauve & M.J. Wargo. 2015. "Growth and Laboratory Maintenance of *Pseudomonas aeruginosa*". *Current protocols in microbiology* Chapter 6.
- B.S. Scales, R.P. Dickson, J.J. LiPuma & G.B. Huffnagle. 2014. "Microbiology, Genomics and Clinical Significance of the *Pseudomonas fluorescens* Species Complex, an Unappreciated Colonizer of Humans". *Clinical Microbiology Reviews*, 27: 927-948.
- A. Passer & M. Khan. "*Pseudomonas fluorescens* grows better in glucose-enriched LB media than in LB media alone".
- Center for Biofilm Engineering. Montana State University. "Biofilm Basics: Section 1".

Alumno: Rodrigo Herrera Sanz

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (CAMPUS DE PALENCIA). E.T.S. de Ingenierías Agrarias

Titulación: Grado en Ingeniería Forestal y del Medio Natural

ANEJO XI: BIBLIOGRAFÍA

- N.M. Elekhtyar. 2015. "Efficiency of *Pseudomonas fluorescens* as Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) for the Enhancement of Seedling Vigo, Nitrogen Uptake, Yield and its Attributes of Rice (*Oryza sativa* L.)" *Microbiology*, 35: 129-134.
- C.J. John et al. 2017. "*Pseudomonas fluorescens* R68 assisted enhancement in growth and fertilizer utilization of *Amaranthus tricolor* (L.)"
- M.V.B. Figueiredo, A. Bonifacio, A.C. Rodrigues & F.F. de Araujo. 2016. "Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Key Mechanisms of Action". *Microbial-mediated Induced Systemic Resistance in Plants*: 23-34.
- N. Jahan, et al. 2018. "Evaluation of the growth performance of *Trichoderma harzianum* (Rifai.) on different culture media". *Journal of Agriculture and Veterinary Science*, 3: 44-50.
- "Consensus Document on Information Used in the Assessment of Environmental Applications Involving *Pseudomonas*". OECD 1997.
- I. Lebert, C. Begot & A.M. Lebert. 1998. "Growth of *Pseudomonas fluorescens* and *P.fragi* in a meat medium as affected by pH (5.8-7.0), water activity (0.97-1.00) and temperature (7-25°C)". *International Journal of Food microbiology*, 39: 53-60.
- K. Brunner et al. 2005. "Improvement of the Fungal Biocontrol Agent *Trichoderma atroviride* to Enhance both Antagonism and Induction of Plant Systemic Disease Resistance". *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 3959-3965.
- U. Schnider et al.1999. "Oxygen-Sensing Reporter Strain of *Pseudomonas fluorescens* for Monitoring the Distribution of Low-Oxygen Habitats in Soil". *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 4085-4093.
- Hao Lin. B.S. 2015. "Prediction of Growth of *Pseudomonas fluorescens* Under Temperature Fluctuation". *Journal of Dairy Science*, 99: 1-9.
- R. Noor, Z. Zeba & M.S. Munna. 2016. "Influence of temperature on the growth of *Pseudomonas putida*". *Stamford Journal of Microbiology*,5: 9-12.
- R.Y. Stainer, N.J. Palleroni & M. Doudoroff. 1965. "The Aerobic Pseudomonads: a Taxonomic Study". Department of Bacteriology and Immunology, University of California, Berkeley, California, U.S.A.
- P. Fonseca, R. Moreno & F. Rojo. 2011. "Growth of *Pseudomonas putida* at low temperature: global transcriptomic and proteomic analyses". *Environmental Microbiology Reports*, 3: 329-339.

2.2 BIBLIOGRAFÍA ANEJO IV: DISEÑO DE LA LÍNEA PRODUCTIVA

- C. Petrisor, A. Paica & F. Constantinescu. 2016. "INFLUENCE OF ABIOTIC FACTORS ON IN VITRO GROWTH OF *TRICHODERMA* STRAINS". The Publishing House of the Romanian Academy: 11-14.
- A. Zehra, M.K. Dubey, M. Meena & R. Upadhyay. 2017. "Effect of different environmental conditions on growth and sporulation of some *Trichoderma* species". *Journal of Environmental Biology*, 38: 197-203.

- G.R. Knudsen & L. Bin. 1990. "Effects of Temperature, Soil Moisture and Wheat Bran on Growth of *Trichoderma harzianum* from Alginate Pellets". *Phytopathology*, 80: 724-727.
- R.K. Jayaswal, R. Singh & Y. Su Lee. 2003. "Influence of Physiological and Environmental Factors on Growth and Sporulation of an Antagonistic Strain of *Trichoderma viride* RSR 7". *Microbiology*, 31: 36-41.
- S. Aryal. 2018. "Nutrient Agar: Composition, Preparation and Uses".
- J. Stoops, P. Maes, J. Claes & L. V. Campenhout. 2011. "Growth of *Pseudomonas fluorescens* in modified atmosphere packaged tofu". *Letters in Applied Microbiology* 54: 195-202.
- N. A. Sinclair & J. L. Stokes. 1961. "Factors Which Control Maximal Growth of Bacteria". *Journal of Bacteriology*, 83: 1147-1154.
- E. Belal & M.El-Nady. 2013. "Bioremediation of pendimethalin-contaminated soil" *African Journal of Microbiology Research*, 7: 2574-2588.
- J.M. Kanyinda & P. Thonart. 2013. "Optimisation of production, freeze-drying and storage of *Pseudomonas fluorescens* BTP1".
- D. Stephan, A.P. Matos Da Silva & I.L. Bisutti. 2015. "Optimization of a freeze-drying process for the biocontrol agent *Pseudomonas spp.* And its influence on viability, storability and efficacy".
- D. Witkowska et. al. 2017. "Effect of Lyophilization on Survivability and Growth Kinetic of *Trichoderma* Strains Preserved on Various Agriculture By-Products".
- M. Czarnecka et al. 2018. "The effect of lyophilization and storage time on the survival rate and hydrolytic activity of *Trichoderma* strains".
- S. Peighami-Ashnaei et al. 2009. "Interaction of different media on production and biocontrol efficacy of *Pseudomonas fluorescens* P-35 and *Bacillus subtilis* B-3 against grey mould of apple".
- I. Coban & S. Sargin. 2019. "Production of *Trichoderma* propagules as a biocontrol agent in static liquid culture conditions by using an integrated bioreactor system".
- S.E. Vecht et. al. 1988." The growth of *Pseudomonas putida* on m-toluic acid and on toluene in batch and chemostat cultures".
- A.A. Aguayo et. al. 2018. "Efecto de *Trichoderma harzianum* en el control de mildiu (*Pseudoperonospora cubensis*) en pepino"
- J.B. Merchán-Gaitán et. Al. "Efecto de dos cepas de *Trichoderma* en el control de *Botrytis cinerea* y la calidad del fruto en fresa (*Fragaria spp.*)"

2.3 BIBLIOGRAFÍA ANEJO VII: ESTUDIO DE IMPACTO AMBIENTAL

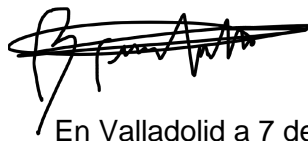
- J.A. Oria de Rueda Salgueiro. 2018. "HISTORIA DE LOS BOSQUES Y DEL ANATURALEZA DE PALENCIA".
- J.A. Oria de Rueda Salgueiro. 2015. "LOS PAISAJES DE PALENCIA".

-Plan General de Ordenación Urbana de Palencia: Impacto Ambiental. 2008.

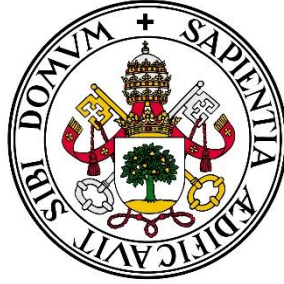
2.4 BIBLIOGRAFÍA ANEJO IX: VIABILIDAD Y COMPETENCIA

- "Global Biofertilizers Market Analysis, Trends, and Forecasts 2020-2025".
Businesswire. 2020.

FDO. RODRIGO HERRERA SANZ



En Valladolid a 7 de junio de 2020



Universidad de Valladolid

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍAS AGRARIAS

Grado en Ingeniería Forestal y del Medio Natural

Proyecto de diseño de línea de producción de bacterias y hongos para la mejora de suelos forestales.

DOCUMENTO N°2. PLANOS

Alumno: Rodrigo Herrera Sanz

Tutor: María Elena Hidalgo Rodríguez

Cotutor: Joaquín Navarro Hevia

Director: Jaime Olaizola Suárez

Índice de los Planos

PLANOS I. PLANO DE LOCALIZACIÓN

PLANO 1. PLANO DE LOCALIZACIÓN

PLANOS II. PLANO DE SITUACIÓN

PLANO 2. PLANO DE SITUACIÓN

PLANOS III. FLUJOS DEL PROCESO PRODUCTIVO

PLANO 3.1 PLANO DE FLUJOS DEL CICLO PRODUCTIVO DE
TRICHODERMA SPP.

PLANO 3.2 PLANO DE FLUJOS DEL CICLO PRODUCTIVO DE
PSEUDOMONAS SPP.

PLANOS IV. MAQUINARIA Y HERRAMIENTAS DEL PROCESO PRODUCTIVO

PLANO 4.1 PLANO DETALLE DEL MODELO DE BIOFERMENTADOR
F1 MB-3

PLANO 4.2 PLANO DETALLE DEL MODELO DE BIOFERMENTADOR
F2 MB-30

PLANO 4.3 PLANO DETALLE DEL MODELO DE BIOFERMENTADOR
F3 MB-100

PLANO 4.4 PLANO DETALLE DEL MODELO DE LIOFILIZADOR
KEMOLO FD-50

PLANO 4.5 PLANO DETALLE DEL MODELO DE AUTOCLAVE
CELITRON A-456

PLANO 4.6 PLANO DETALLE DE LA CÁMARA FRIGORÍFICA IMPAFRI

PLANO 4.7 PLANO DETALLE DE LA DISTRIBUCIÓN DE LA LÍNEA DE
PRODUCCIÓN DE *TRICHODERMA SPP.*

PLANO 4.8 PLANO DETALLE DE LA DISTRIBUCIÓN DE LA LÍNEA DE
PRODUCCIÓN DE *PSEUDOMONAS SPP.*

PLANO 4.9 PLANO DETALLE DEL FREGADERO DE ACERO INOXIDABLE

PLANO 4.10 PLANO DETALLE DE LAS GARRAFAS ESTERILIZABLES
THERMO SCIENTIFIC™

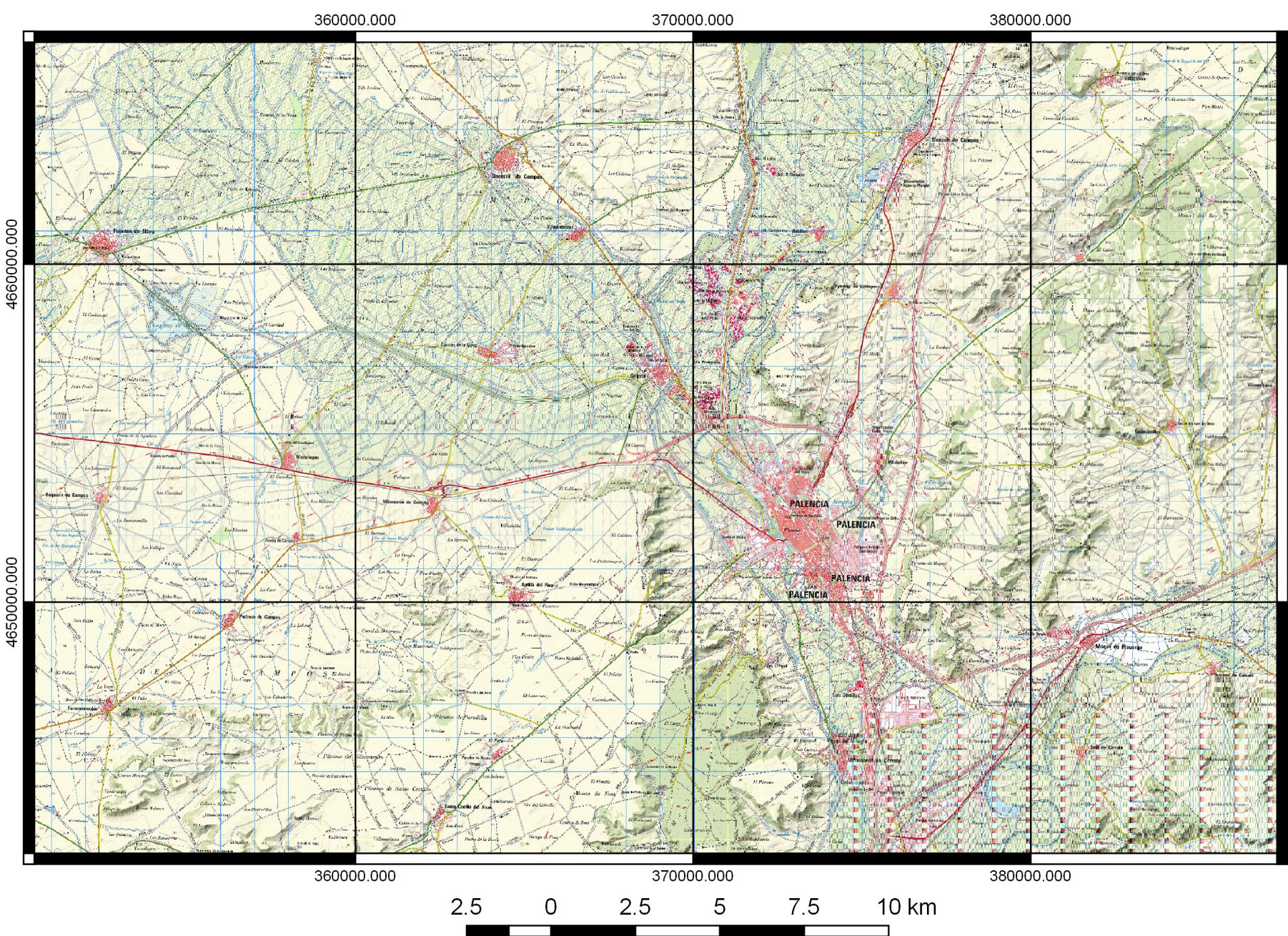
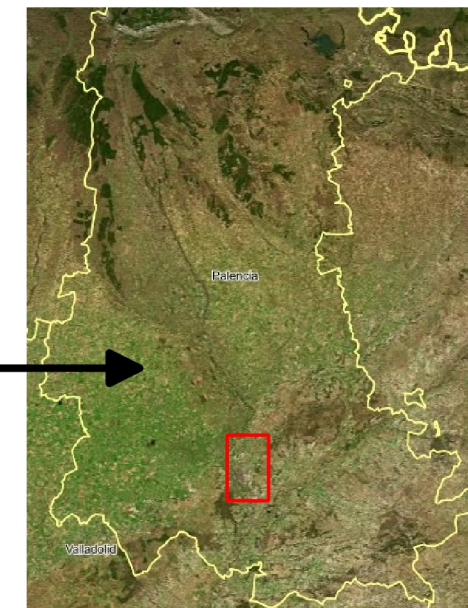
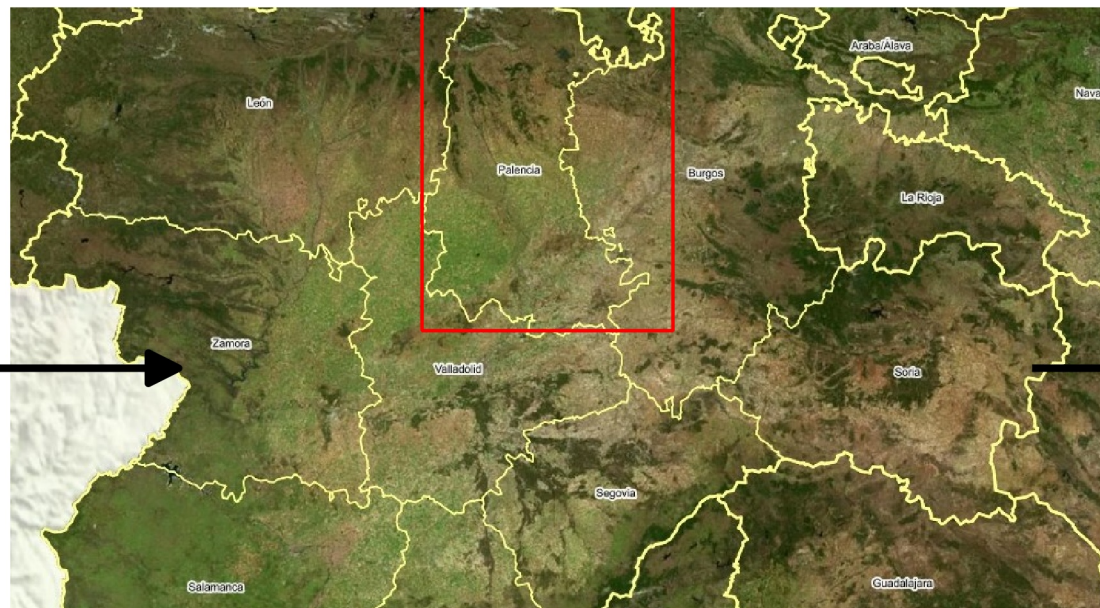
PLANO 4.11 PLANO DETALLE DEL CARRITO DE SERVICIO DE ACERO
INOXIDABLE

PLANO 4.12 PLANO DETALLE DE LAS BANDEJAS DE LIOFILIZACIÓN
TECLEN LYOPROTECT®

PLANOS V. ETIQUETADO Y ENVASADO

PLANO 5.1 PLANO DETALLE DEL ETIQUETADO ESTANDAR,
DIMENSIONES Y DISPOSICIÓN

PLANO 5.2 PLANO DETALLE DEL DISEÑO DE EMBALAJE

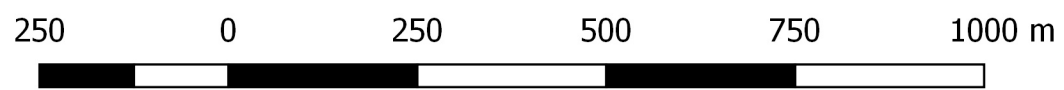



SRC: ETRS89 / UTM 30N
 COORDENADA X: 375.464,37
 COORDENADA Y: 4.650.926,65

 UNIVERSIDAD DE VALLADOLID   Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias Palencia		
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍAS AGRARIAS		
PROYECTO: PROYECTO DE DISEÑO DE UNA LÍNEA DE PRODUCCIÓN DE HONGOS Y BACTERIAS PARA LA MEJORA DE SUELOS FORESTALES		
PLANO: PLANO DE LOCALIZACIÓN		
PROMOTOR: IDForest-Biotecnología Forestal Aplicada S.L.		NÚMERO: 1
EMPLAZAMIENTO: Palencia	AUTOR Y FECHA: Grado en Ingeniería Forestal y del Medio Natural. En Valladolid, a 1 de junio de 2020  FDC Rodrigo Herrera Sanz	ESCALA: 1:130000



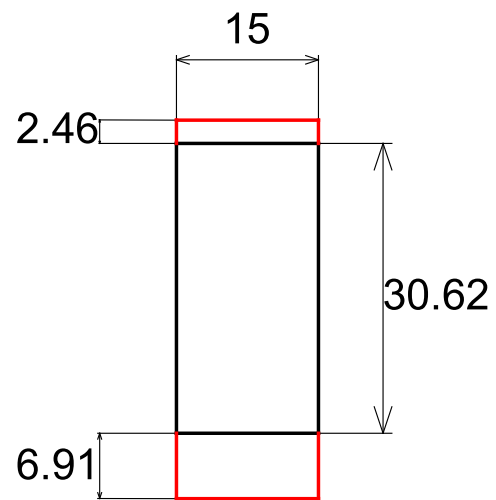
SRC: ETRS89 /UTM 30N
 COORDENADAS X: 375.464,37
 COORDENADAS Y: 4.650.926,65
 SUPERFÍCIE (ha): 0,06



 UNIVERSIDAD DE VALLADOLID ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍAS AGRARIAS		 
PROYECTO: PROYECTO DE DISEÑO DE UNA LÍNEA DE PRODUCCIÓN DE HONGOS Y BACTERIAS PARA LA MEJORA DE SUELOS FORESTALES		
PLANO: PLANO DE SITUACIÓN		
PROMOTOR: IDForest-Biotecnología Forestal Aplicada S.L.		NÚMERO: 2.1
EMPLAZAMIENTO: Palencia	AUTOR Y FECHA: Grado en Ingeniería Forestal y del Medio Natural En Valladolid, a 1 de junio de 2020 FDO. Rodrigo Herrera Sanz	ESCALA: 1:10000

Instalaciones del proyecto

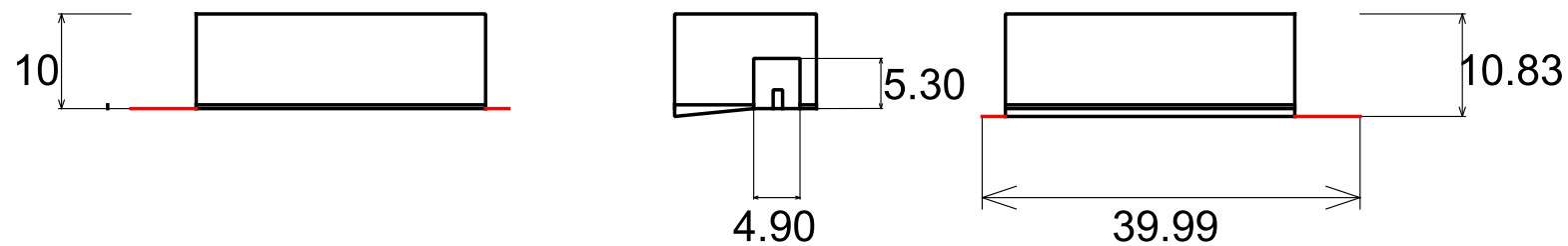
Planta



Perfil

Alzado

Perfil

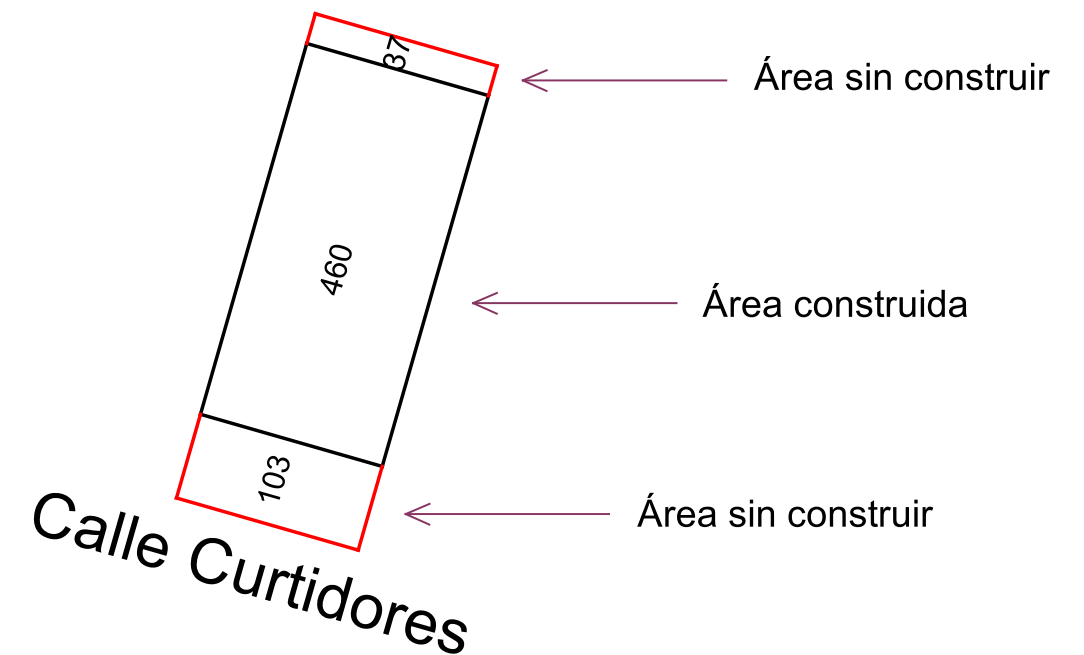


Leyenda

- Área no construida
- Área construida

Escala: 1:800
Cotas en metros

Superficie Instalaciones

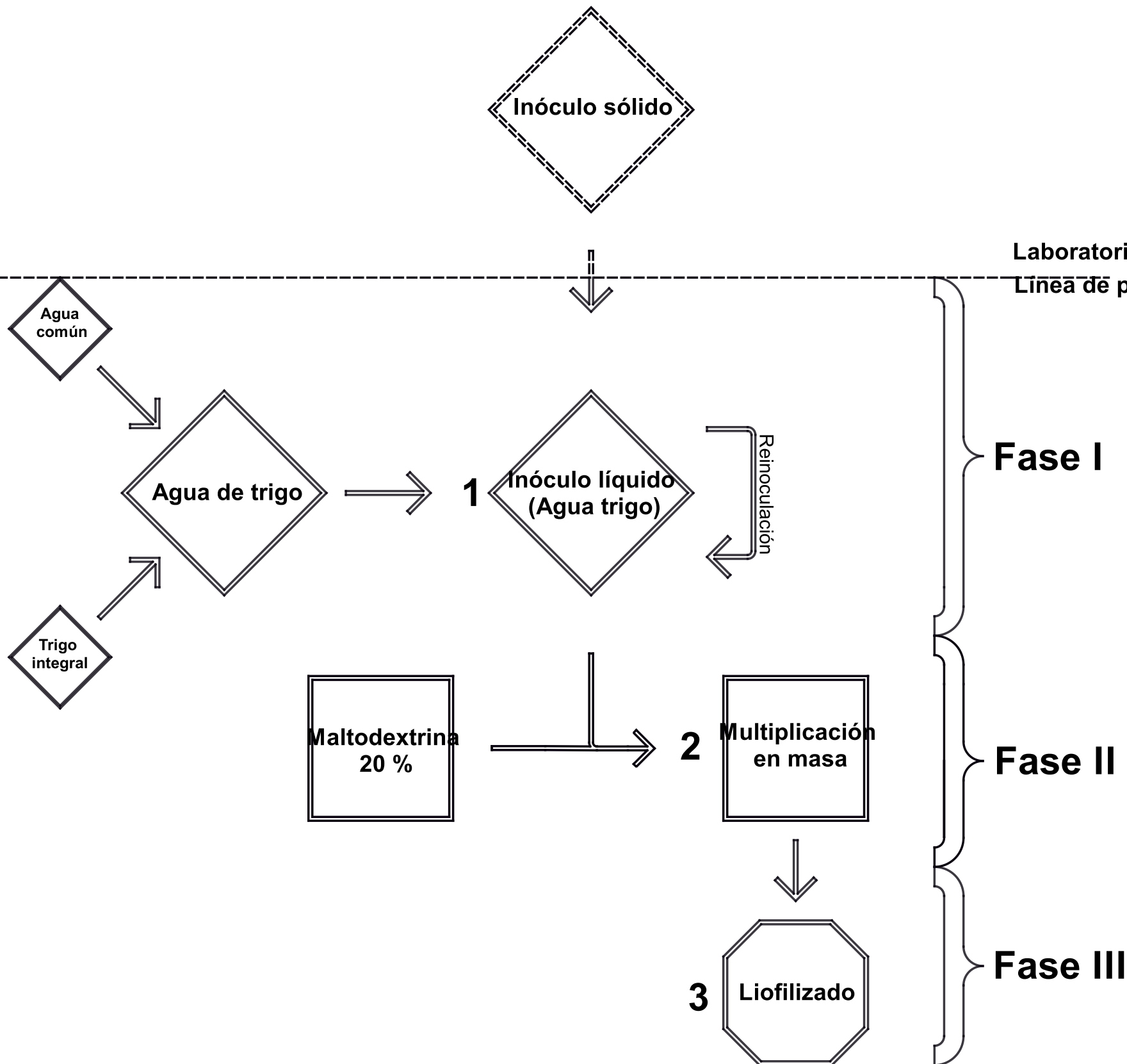


Escala: 1:600
Relación de las superficies de las instalaciones
Cotas en metros cuadrados

 UNIVERSIDAD DE VALLADOLID <small>UVA</small> 	
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERIAS AGRARIAS	
PROYECTO: PROYECTO DE DISEÑO DE UNA LÍNEA DE PRODUCCIÓN DE HONGOS Y BACTERIAS PARA LA MEJORA DE SUELOS FORESTALES	
PLANO: PLANO DETALLE DE LAS INSTALACIONES DEL PROYECTO	
PROMOTOR: IDForest-Biotecnología Forestal Aplicada S.L.	NÚMERO: 2.2
EMPLAZAMIENTO: Palencia	AUTOR Y FECHA: Grado en Ingeniería Forestal y del Medio Natural En Valladolid, a 4 de junio de 2020  FDO. Rodrigo Herrera Sanz
ESCALA: Varias	

Flujos del ciclo productivo de Trichoderma spp.

El mapa "Flujos del ciclo productivo de Trichoderma spp.", muestra el proceso productivo de las especies objetivo pertenecientes al género Trichoderma. En él se describen las distintas fases que lo componen, su localización y los componentes que intervienen en cada fase.



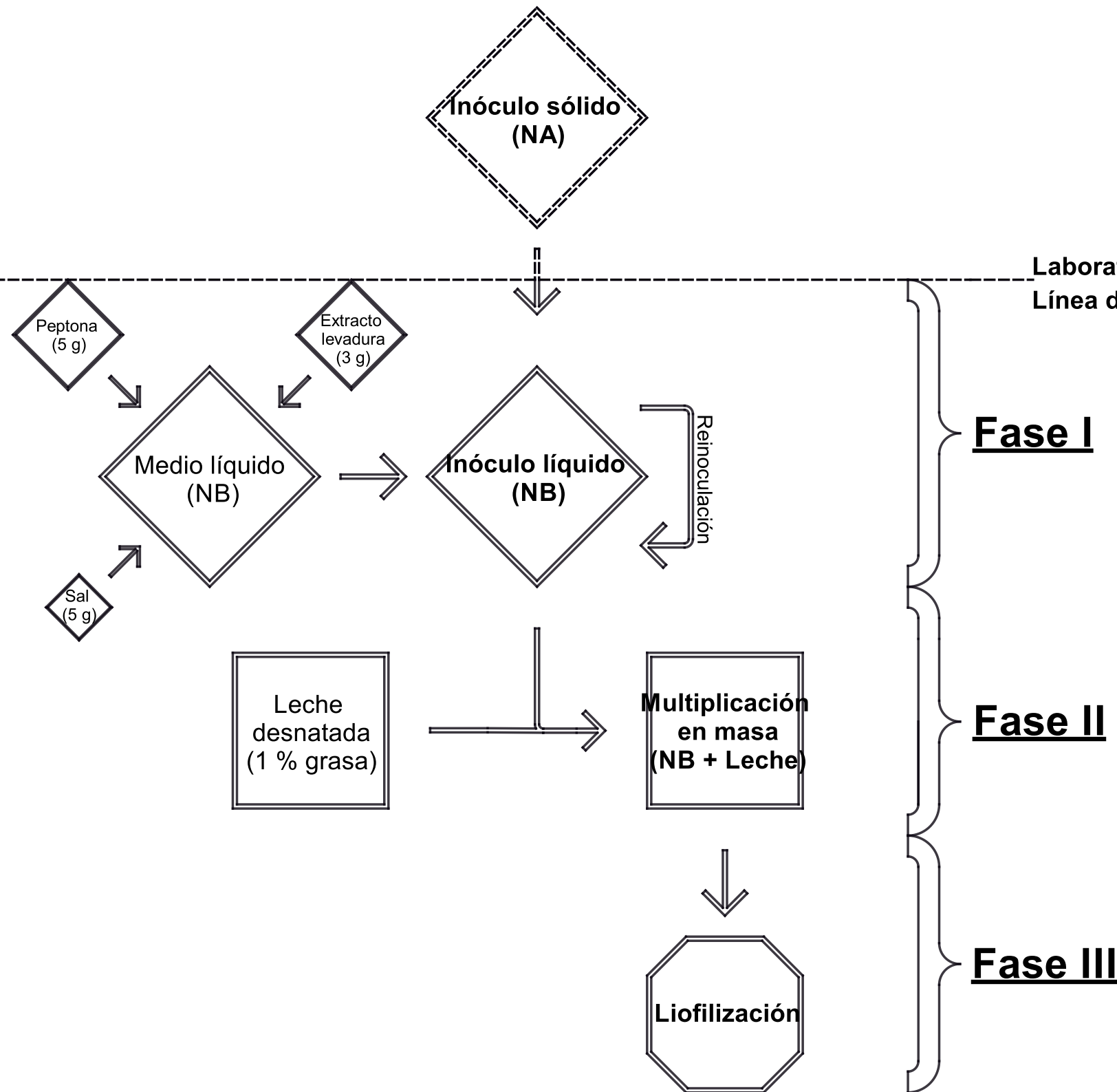
Laboratorio promotor
Línea de producción

Escriba el texto aquí

 UNIVERSIDAD DE VALLADOLID		
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍAS AGRARIAS		
PROYECTO: PROYECTO DE DISEÑO DE UNA LÍNEA DE PRODUCCIÓN DE HONGOS Y BACTERIAS PARA LA MEJORA DE SUELOS FORESTALES		
PLANO: PLANO DE FLUJOS DEL CICLO PRODUCTIVO DE TRICHODERMA SPP.		
PROMOTOR: IDForest-Biotecnología Forestal Aplicada S.L.		NÚMERO: 3.1
EMPLAZAMIENTO: Palencia	AUTOR Y FECHA: Grado en Ingeniería Forestal y del Medio Natural En Valladolid, a 18 de abril de 2020  FDC Rodrigo Herrera Sanz	ESCALA: Sin escala

Flujos del ciclo productivo de Pseudomonas spp.

El mapa "Flujos del ciclo productivo de Pseudomonas spp.", muestra el proceso productivo de las especies objetivo pertenecientes al género Pseudomonas. En él se describen las distintas fases que lo componen, su localización y los componentes que intervienen en cada fase.



Laboratorio promotor
Línea de producción

Fase I

Fase II

Fase III

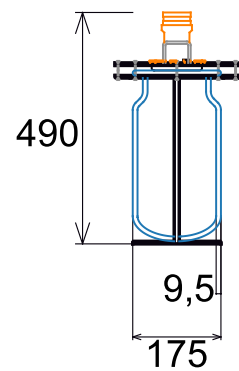
 UNIVERSIDAD DE VALLADOLID   <small>Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias Palencia</small>		
<small>Universidad de Valladolid</small> ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍAS AGRARIAS		
PROYECTO: PROYECTO DE DISEÑO DE UNA LÍNEA DE PRODUCCIÓN DE HONGOS Y BACTERIAS PARA LA MEJORA DE SUELOS FORESTALES		
PLANO: PLANO DE FLUJOS DEL CICLO PRODUCTIVO DE PSEUDOMONAS SPP.		
PROMOTOR: IDForest-Biotecnología Forestal Aplicada S.L.		NÚMERO: 3.2
EMPLAZAMIENTO: Palencia	AUTOR Y FECHA: <small>Grado en Ingeniería Forestal y del Medio Natural. En Valladolid, a 19 de abril de 2020.</small>  <small>FDC/ Rodrigo Herrera Sanz</small>	ESCALA: Sin escala

Biorreactor F1 MB-3 (Tanque)

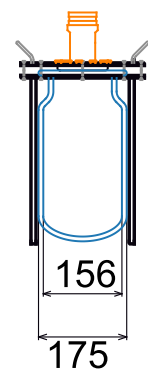
Planta



Perfil

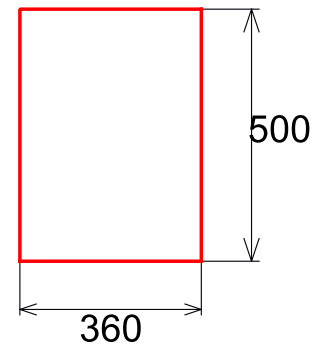


Alzado

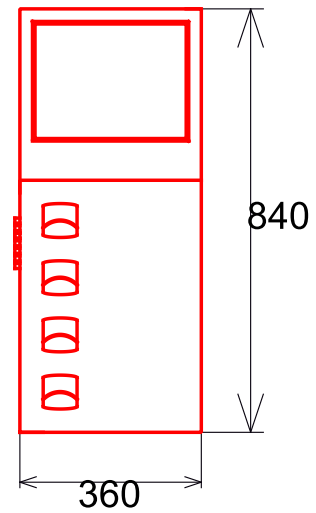


Biorreactor F1 MB-3 (FCU)

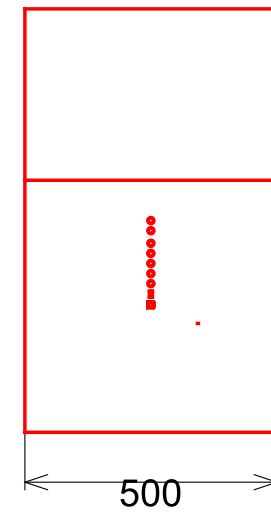
Planta



Alzado



Perfil



Leyenda

— Tanque

Materiales

— Acero A-316

— Acero A-304

— Goma de unión

Sistemas de control

— FCU/Sistema de control

— Sensores/Puertos

Cotas en milímetros

CARACTERÍSTICAS TÉCNICAS

Potencia eléctrica:	2 kw	
Número de puertos:	12	
Materiales:	Acero A316	Componentes en contacto con el tanque
	Acero A304	FCU y componentes metálicos sin contacto con el tanque
	Vidrio Borosilicato	Tanque



Universidad de Valladolid

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍAS AGRARIAS



PROYECTO:

PROYECTO DE DISEÑO DE UNA LÍNEA DE PRODUCCIÓN DE HONGOS Y BACTERIAS PARA LA MEJORA DE SUELOS FORESTALES

PLANO:

PLANO DETALLE DEL MODELO DE BIOFERMENTADOR F1 MB-3

PROMOTOR:

IDForest-Biotecnología Forestal Aplicada S.L.

Número:

4.1

EMPLAZAMIENTO:

Palencia

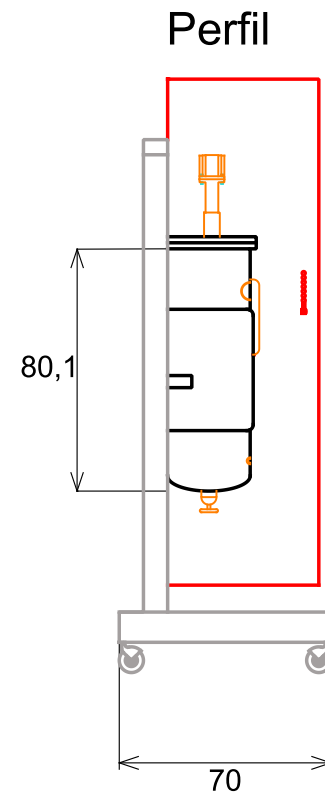
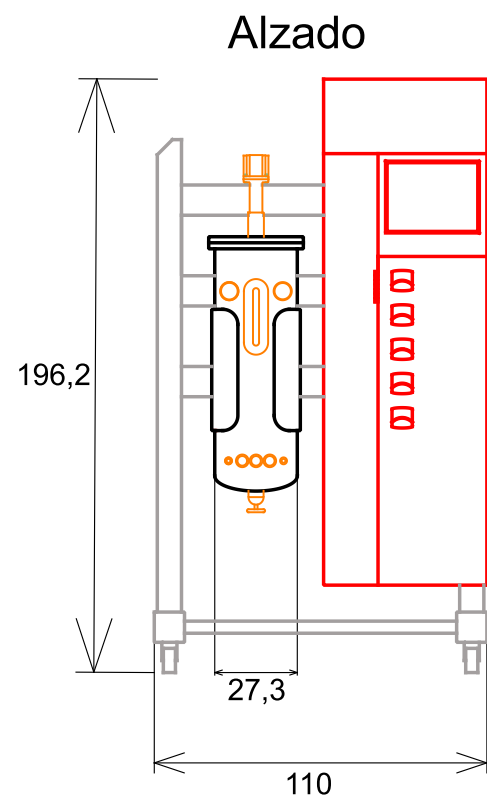
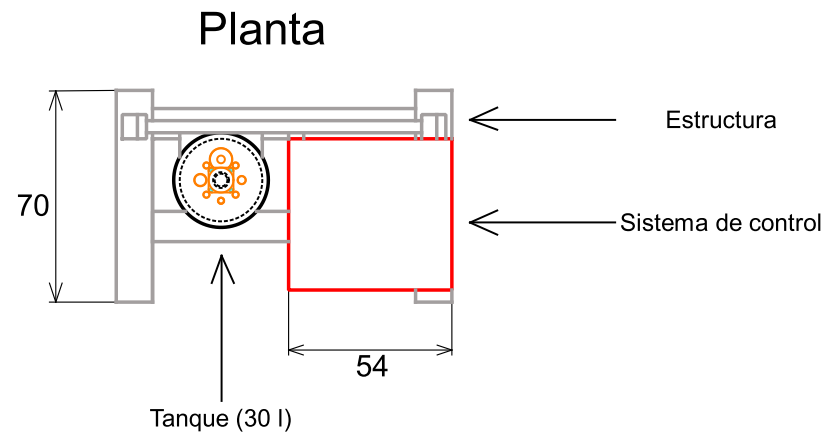
AUTOR Y FECHA:

Grado en Ingeniería Forestal y del Medio Natural
En Valladolid a 17 de abril de 2020


FDC, Rodrigo Herrera Sanz

ESCALA:

1:15



Cotas en centímetros

Leyenda

Cámara interna

Materiales

Acero A316

Acero A304

Sistema de control

Sensores/ Puertos

FCU/ Sistema de control

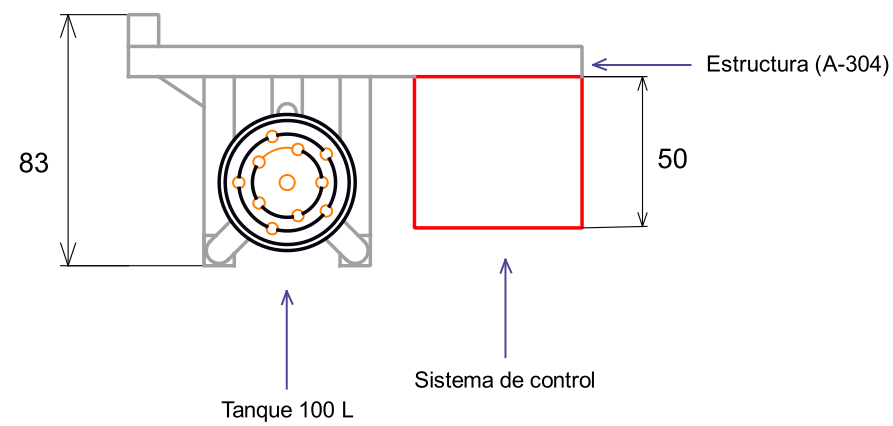
CARACTERÍSTICAS TÉCNICAS

Potencia eléctrica:		5,5 kw
Número de puertos:		20
Materiales	Acero A-316	Tanque
	Acero A-304	FCU y estructura

 UNIVERSIDAD DE VALLADOLID ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍAS AGRARIAS		  Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias Palencia
<p>PROYECTO: PROYECTO DE DISEÑO DE UNA LÍNEA DE PRODUCCIÓN DE HONGOS Y BACTERIAS PARA LA MEJORA DE SUELOS FORESTALES</p>		
<p>PLANO: PLANO DETALLE DEL MODELO DE BIOFERMENTADOR BIONET F2 MB-30</p>		
<p>PROMOTOR: IDForest-Biotecnología Forestal Aplicada S.L.</p>		<p>NÚMERO: 4.2</p>
<p>EMPLAZAMIENTO: Palencia</p>	<p>AUTOR Y FECHA: Grado en Ingeniería Forestal y Medio Natural En Valladolid a 26 de abril de 2020 FDO. Rodrigo Herrera Sanz</p>	<p>ESCALA: 1:25</p>

BIORREACTOR F3 MB-100 (TANQUE + FCU)

Planta

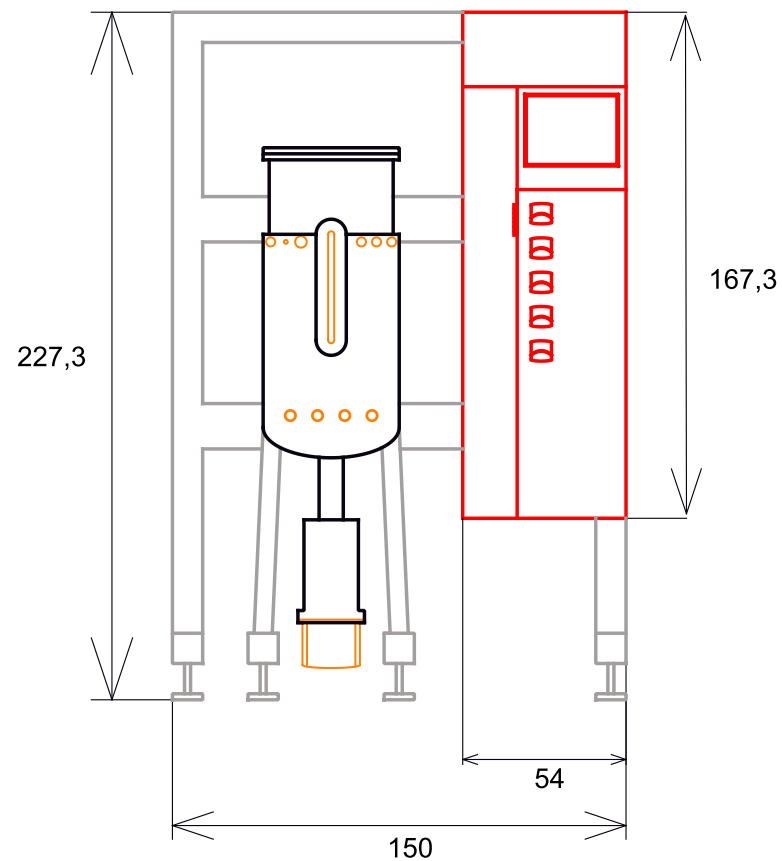


Tanque 100 L

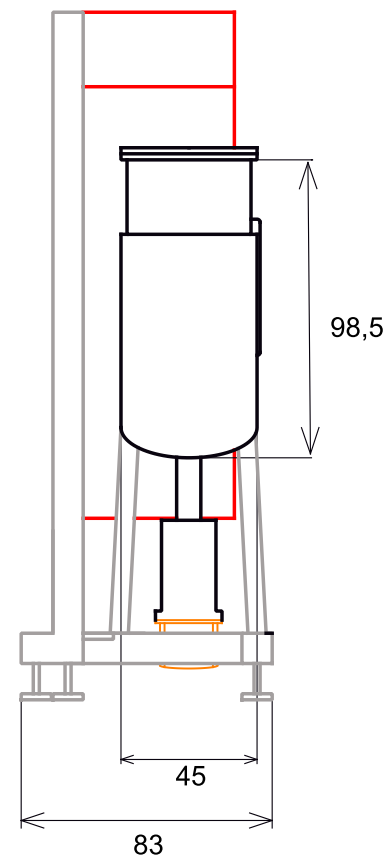
Sistema de control

Estructura (A-304)

Alzado



Perfil



Cotas en centímetros

Leyenda

MATERIALES

— Acero A-316

— Acero A-304

SISTEMAS DE CONTROL

— FCU/Sistema de control

— Sensores/Puertos

CARACTERÍSTICAS TÉCNICAS

Potencia eléctrica: 6,5 kw

Número de puertos: 24

Materiales

Acero A-316: Tanque

Acero A-304: FCU y estructura



Universidad de Valladolid

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍAS AGRARIAS



UVa IAP Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias Palencia

PROYECTO:

PROYECTO DE DISEÑO DE UNA LÍNEA DE PRODUCCIÓN DE HONGOS Y BACTERIAS PARA LA MEJORA DE SUELOS FORESTALES

PLANO:

PLANO DETALLE DEL MODELO DE BIORREACTOR F3 MB-100

PROMOTOR:

IDForest-Biotecnología Forestal aplicada S.L.

NÚMERO:

4.3

EMPLAZAMIENTO:

Palencia

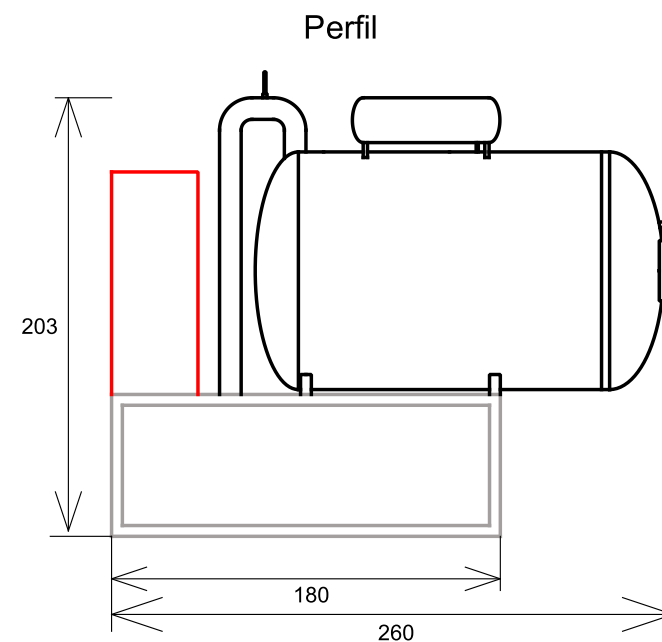
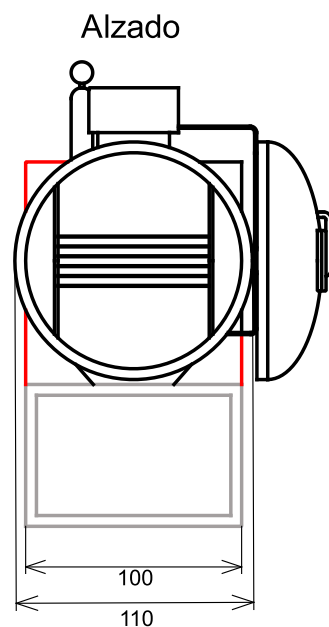
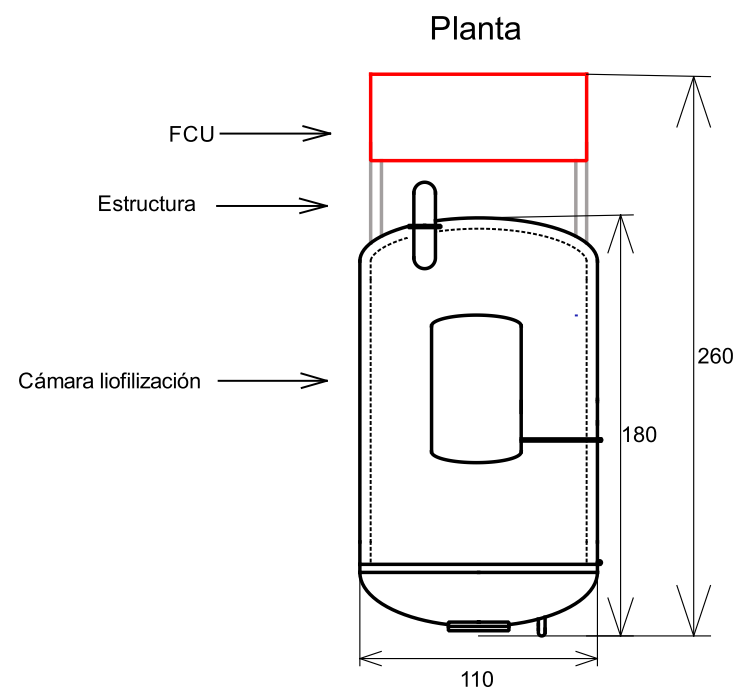
AUTOR Y FECHA:

Grado en Ingeniería Agraria y Medio Natural
En Valladolid, a 17 de abril de 2020
FDO: Rodrigo Herrera Sanz

ESCALA:

1:25

Liofilizador FD-50



Cotas en centímetros

Leyenda

Cámara interior
FCU/Sistema de control

Material
Acero SUS304

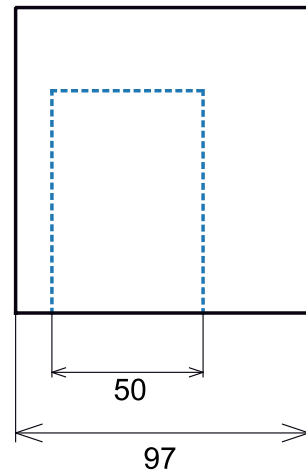
CARACTERÍSTICAS TÉCNICAS

Potencia eléctrica:		10 kw
Refrigerante:		R404A
Área de instalación:		9 metros cuadrados
Peso estimado:		2000 kg
Material:	Acero SUS 304	Compone la cámara, el condensador, la puerta, las bandejas y la estructura inferior

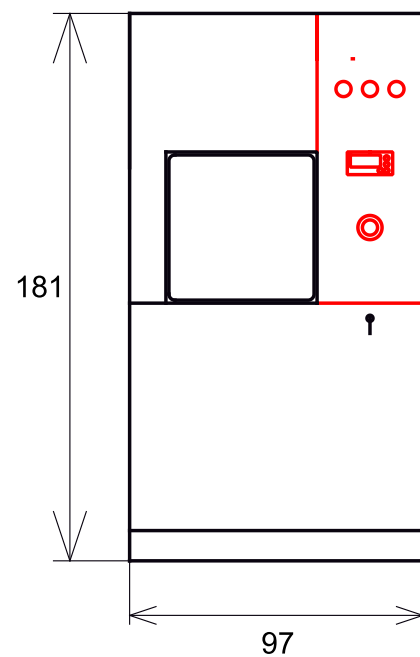
 UNIVERSIDAD DE VALLADOLID ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍAS AGRARIAS		  Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias Palencia
PROYECTO: PROYECTO DE DISEÑO DE UNA LÍNEA DE PRODUCCIÓN DE HONGOS Y BACTERIAS PARA LA MEJORA DE SUELOS FORESTALES		
PLANO: PLANO DETALLE DEL MODELO DE LIOFILIZADOR KEMOLO FD50		
PROMOTOR: IDForest-Biotecnología Forestal Aplicada S.L.		NÚMERO: 4.4
EMPLAZAMIENTO: Palencia	AUTOR Y FECHA: Grado en Ingeniería Forestal y del Medio Natural En Valladolid, a 18 de mayo de 2010 FDO. Rodrigo Herrera Sanz	ESCALA: 1:35

Autoclave celitron A-456

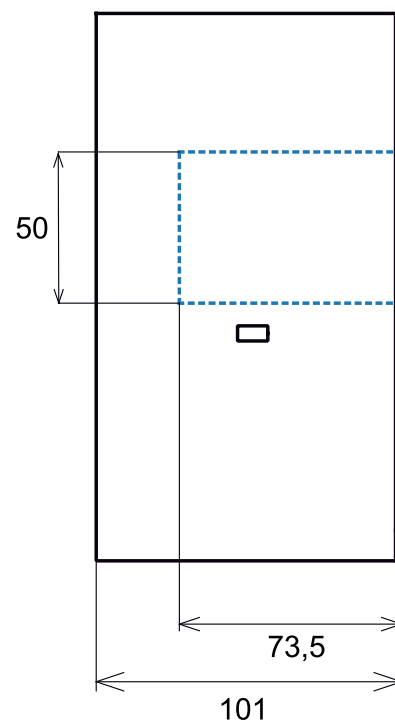
Planta



Alzado



Perfil






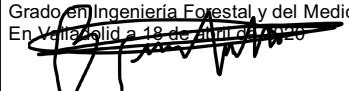
Cotas en centímetros

Leyenda

- Acero 316L
- Sistema de control
- Cámara interior

CARACTERÍSTICAS TÉCNICAS

Potencia eléctrica:		2 kw
Volumen de trabajo:		183,75 L
Peso estimado:		550 kg
Materiales:	Acero 316 L	Cámara interna
	Acero 304 L	Tuberías y exterior

 UNIVERSIDAD DE VALLADOLID ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍAS AGRARIAS		  Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias Palencia
Proyecto: PROYECTO DE DISEÑO DE UNA LÍNEA DE PRODUCCIÓN DE HONGOS Y BACTERIAS PARA LA MEJORA DE SUELOS FORESTALES		
PLANO: PLANO DETALLE DEL MODELO DE AUTOCLAVE CELITRON A-456		
PROMOTOR: IDForest-Biotecnología Forestal Aplicada S.L.		NÚMERO: 4.5
EMPLAZAMIENTO: Palencia	AUTOR Y FECHA: Grado en Ingeniería Forestal y del Medio Natural En Valladolid a 18 de Junio de 2020  FDO. Rodrigo Herrera Sanz	ESCALA: 1:25

Cámara refrigeradora Impafri 176x136 cm

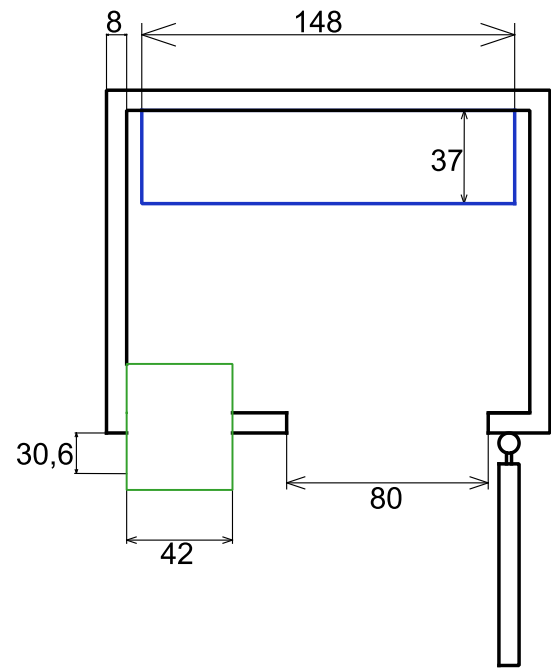
Leyenda

- Sistema de refrigeración
- Estructura
- Estantería

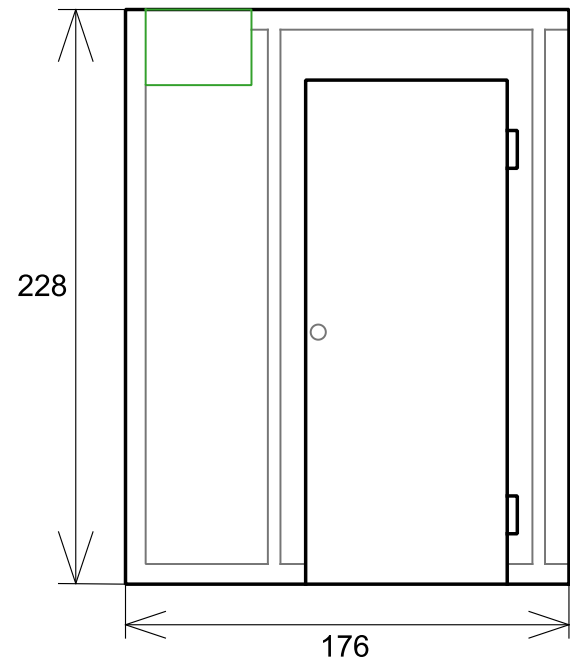
CARACTERÍSTICAS TÉCNICAS

Temperatura interior:	0 - 6 °C
Grosor aislamiento:	80 mm
Sistema de refrigeración:	MCV-NY-0015
Potencia eléctrica:	0,79 kw
Refrigerante:	R 134a

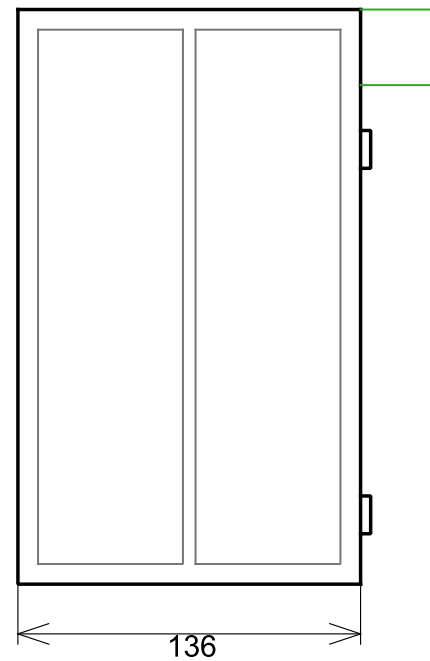
Planta






Alzado



Perfil

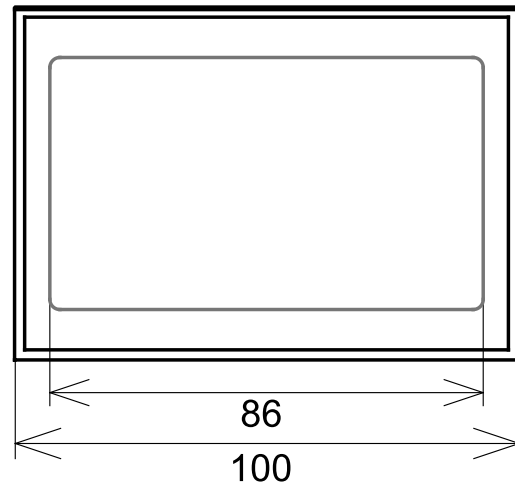


Cotas en centímetros

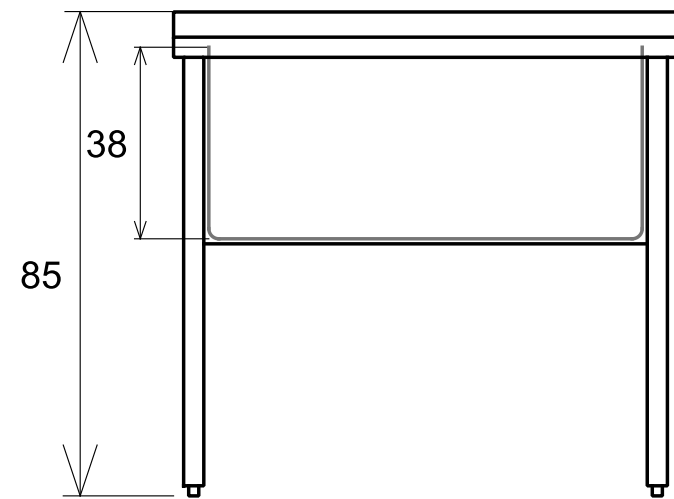
 UNIVERSIDAD DE VALLADOLID <small>ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍAS AGRARIAS</small>	 <small>Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias Palencia</small>	
<p>PROYECTO: PROYECTO DE DISEÑO DE UNA LÍNEA DE PRODUCCIÓN DE HONGOS Y BACTERIAS PARA LA MEJORA DE SUELOS FORESTALES</p>		
<p>PLANO: PLANO DETALLE DE LA CÁMARA FRIGORÍFICA IMPAFRI</p>		
<p>PROMOTOR: IDForest-Biotecnología Forestal Aplicada S.L.</p>	<p>NÚMERO: 4.6</p>	
<p>EMPLAZAMIENTO: Palencia</p>	<p>AUTOR Y FECHA: Grado en Ingeniería Forestal y del Medio Natural En Valladolid, a 2 de mayo de 2020  FDO. Rodrigo Herrera Sanz</p>	<p>ESCALA: 1:30</p>

Fregadero Acero inoxidable

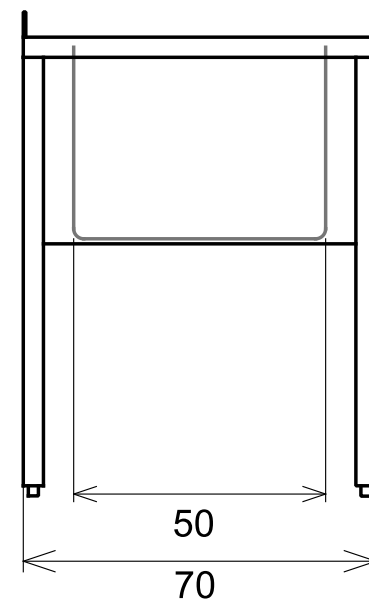
Planta



Alzado



Perfil



Cotas en centímetros

Leyenda

- Estructura
- Cuba

CARACTERÍSTICAS TÉCNICAS

Dimensiones cuba	Largo	86 cm
	Ancho	50 cm
	Fondo	38 cm
Material		Acero AISI 304



Universidad de Valladolid

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍAS AGRARIAS



PROYECTO:

PROYECTO DE DISEÑO DE UNA LÍNEA DE PRODUCCIÓN DE HONGOS Y BACTERIAS PARA LA MEJORA DE SUELOS FORESTALES

PLANO:

PLANO DETALLE DEL FREGADERO DE ACERO INOXIDABLE

PROMOTOR:

IDForest-Biotecnología Forestal Aplicada S.L.

NÚMERO:

4.7

EMPLAZAMIENTO:

Palencia

AUTOR Y FECHA:

Grado en Ingeniería Forestal y del Medio Natural
En Valladolid, a 22 de mayo de 2020.

FDO Rodrigo Herrera Sanz

ESCALA:

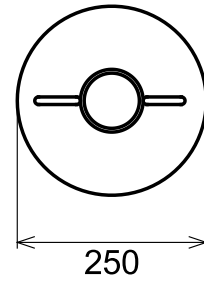
1:15

Garrafas esterilizables Thermo Scientific

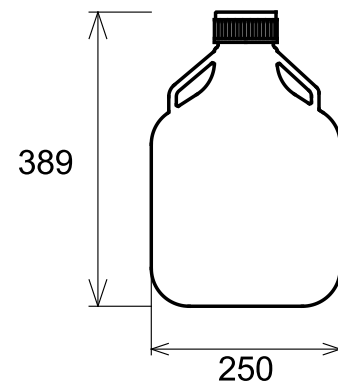
CARACTERÍSTICAS TÉCNICAS

Material	Polipropileno
Volumen	10 l
Diámetro exterior	250 mm
Altura total	389 mm

Planta



Alzado



Perfil



Cotas en milímetros



Universidad de Valladolid

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍAS AGRARIAS



PROYECTO:

PROYECTO DE DISEÑO DE UNA LÍNEA DE PRODUCCIÓN DE HONGOS Y BACTERIAS PARA LA MEJORA DE SUELOS FORESTALES

PLANO:

PLANO DETALLE DE LAS GARRAFAS ESTERILIZABLES THERMO SCIENTIFIC

PROMOTOR:

IDForest-Biotecnología Forestal Aplicada S.L.

NÚMERO:

4.8

EMPLAZAMIENTO:

Palencia

AUTOR Y FECHA:

Grado en Ingeniería Forestal y del Medio Natural
En Valladolid, a 23 de mayo de 2010

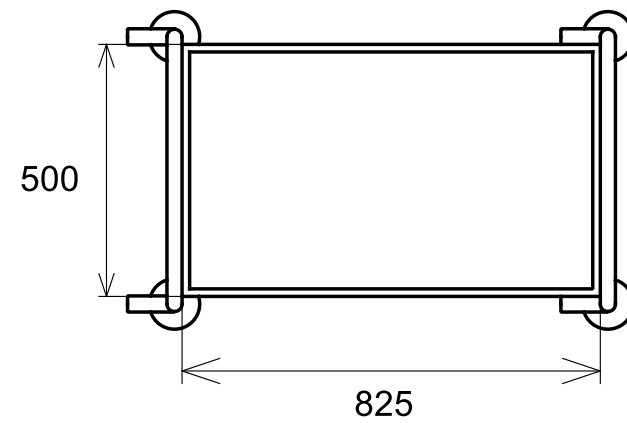
FDO. Rodrigo Herrera Sanz

ESCALA:

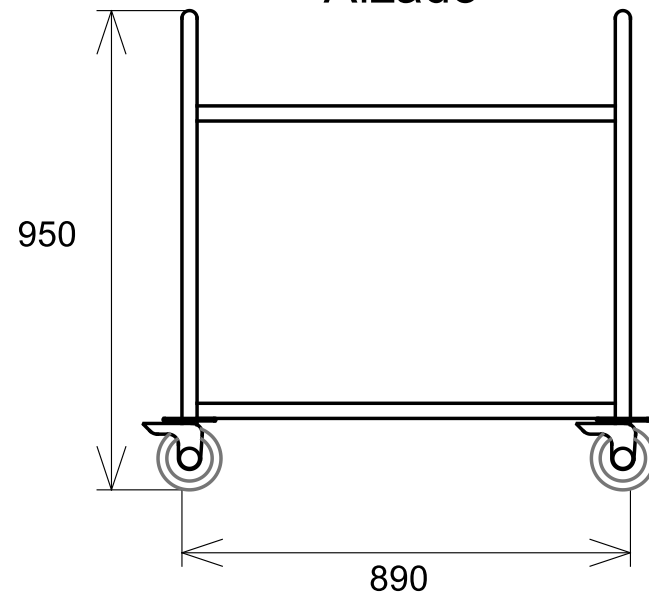
1:10

Carrito de servicio

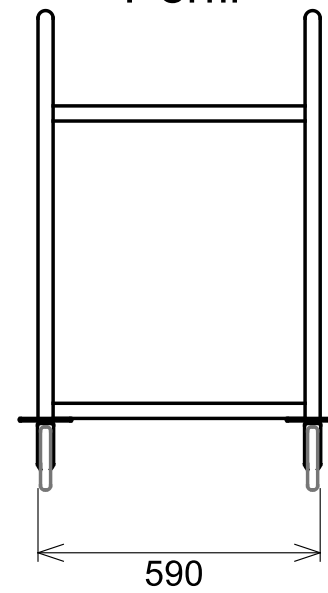
Planta



Alzado



Perfil



Cotas en milímetros

Leyenda

- Goma
- Estructura

CARACTERÍSTICAS TÉCNICAS

Capacidad carga:		100 kg
Número de frenos:		2
Materiales	Acero A-304:	Estructura y bandejas
	Goma:	Ruedas



Universidad de Valladolid

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍAS AGRARIAS



PROYECTO:

PROYECTO DE DISEÑO DE UNA LÍNEA DE PRODUCCIÓN DE HONGOS Y BACTERIAS PARA LA MEJORA DE SUELOS FORESTALES

PLANO:

PLANO DETALLE DEL CARRITO DE SERVICIO DE ACERO INOXIDABLE

PROMOTOR:

IDForest-Biotecnología Forestal aplicada S.L.

NÚMERO:

4.9

EMPLAZAMIENTO:

Palencia

AUTOR Y FECHA:

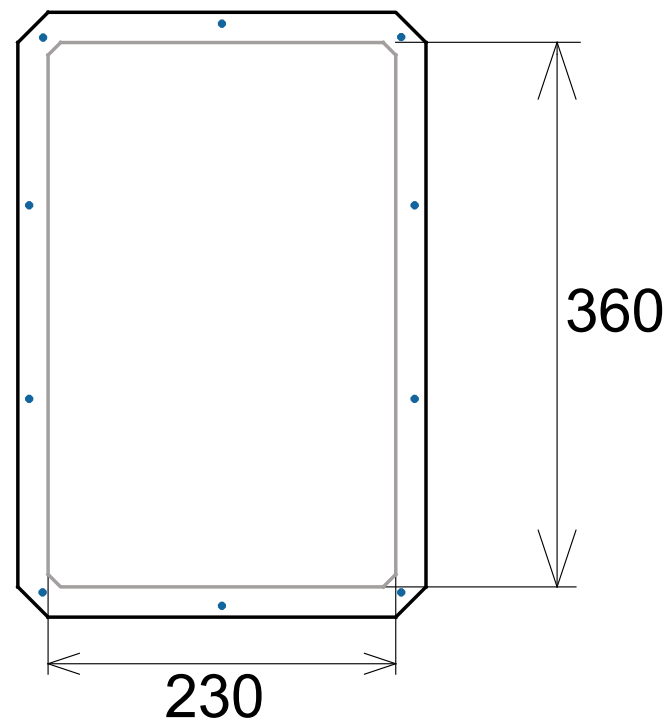
Grado en Ingeniería Forestal y del Medio Natural
En Valladolid a 23 de mayo de 2020
FDO: Rodrigo Herrera Sanz

ESCALA:

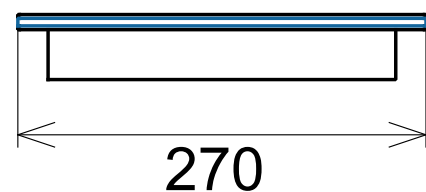
1:15

Bandejas Teclen Lyoprotect

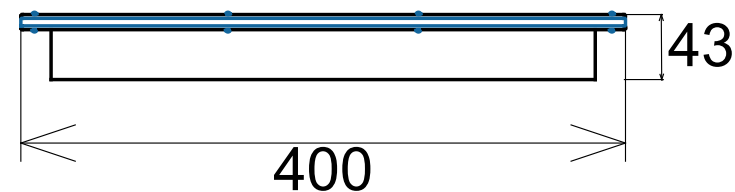
Planta



Alzado



Perfil



Cotas en milímetros

Leyenda

- Uniones
- Membrana
- Estructura

CARACTERÍSTICAS TÉCNICAS

Capacidad Máxima:		1800 ml
Capacidad mínima:		400 ml
Materiales	Acero A-316:	Estructura y tornillos
	Goma:	Uniones



Universidad de Valladolid

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍAS AGRARIAS



Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias Palencia

PROYECTO:

PROYECTO DE DISEÑO DE UNA LÍNEA DE PRODUCCIÓN DE HONGOS Y BACTERIAS PARA LA MEJORA DE SUELOS FORESTALES

PLANO:

PLANO DETALLE DE LAS BANDEJAS DE LIOFILIZACIÓN TECLÉN LYOPROTECT

PROMOTOR:

IDForest-Biotecnología Forestal aplicada S.L.

NÚMERO:

4.10

EMPLAZAMIENTO:

Palencia

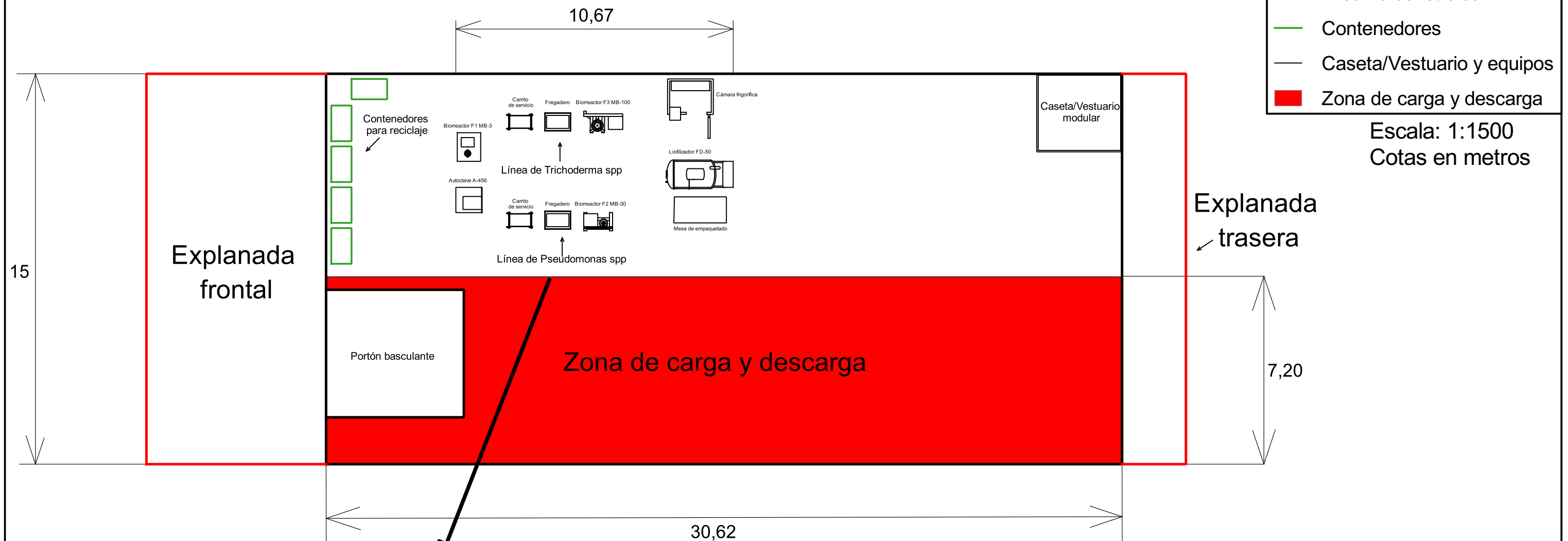
AUTOR Y FECHA:

Grado en Ingeniería Forestal y del Medio Natural
En Valladolid a 23 de mayo de 2020
FDO: Rodrigo Herrera Sanz

ESCALA:

1:5

Plano de distribución de las instalaciones

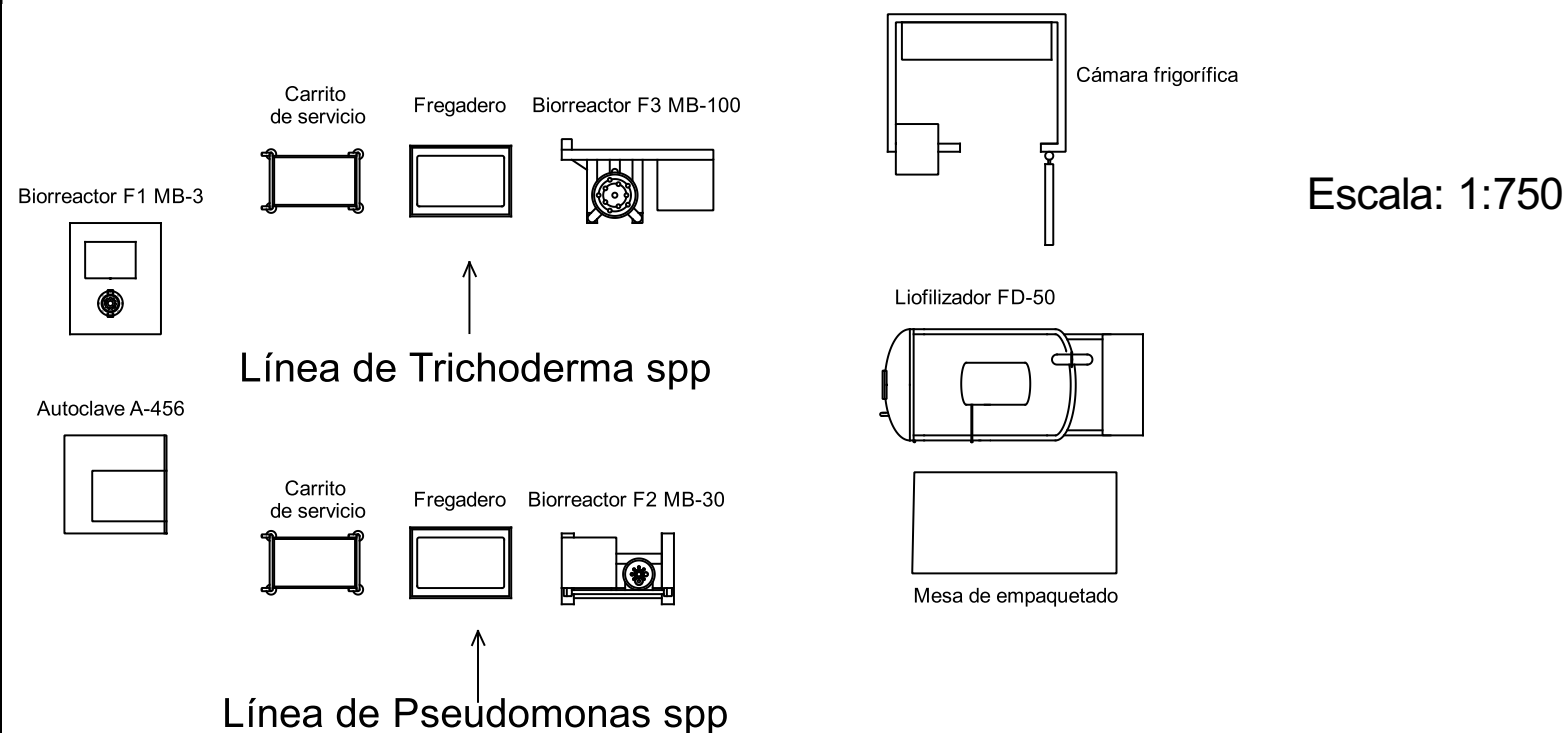


Leyenda

- Área no construida
- Contenedores
- Caseta/Vestuario y equipos
- Zona de carga y descarga

Escala: 1:1500
Cotas en metros

Plano de disposición de las líneas de producción



 UNIVERSIDAD DE VALLADOLID <small>UVa</small>	 ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍAS AGRARIAS	
PROYECTO: PROYECTO DE DISEÑO DE UNA LÍNEA DE PRODUCCIÓN DE HONGOS Y BACTERIAS PARA LA MEJORA DE SUELOS FORESTALES		
PLANO: PLANO DETALLE DE LA DISTRIBUCIÓN DE LAS INSTALACIONES Y DISPOSICIÓN DE LOS EQUIPOS Y LAS LÍNEAS DE PRODUCCIÓN		
PROMOTOR: IDForest-Biotecnología Forestal Aplicada S.L.	NÚMERO: 4.11	
EMPLAZAMIENTO: Palencia	AUTOR Y FECHA: Grado en Ingeniería Forestal y del Medio Natural FDO. Rodrigo Herrera Sanz 2020	ESCALA: Varias

Etiqueta lateral



Nombre producto

Microorganismo no micorrízico

Masa Total:
Masa Neta:
Masa Tara:

COMPOSICIÓN Y CARACTERÍSTICAS:

OBTENCIÓN:

INCOMPATIBILIDADES:

ADVERTENCIA:

MÉTODO DE CONSERVACIÓN:

MÉTODO DE APLICACIÓN:

EFFECTOS:

*Mantener fuera del alcance de los niños

**Mantener lejos de alimentos, bebidas y piensos.

Etiqueta tapa

FECHA DE CADUCIDAD

Nº LOTE:

IDForest-Biotecnología Forestal Aplicada S.A.
Calle Curtidores, 17, 34004 Palencia (España)

DIMENSIONES:

LARGO ETIQUETA:	130 mm
ANCHO ETIQUETA:	55 mm
DIÁMETRO TAPÓN:	62,10 mm
LARGO ETIQUETA TAPÓN:	48 mm
ANCHO ETIQUETA TAPÓN:	28 mm



Universidad de Valladolid

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍAS AGRARIAS



PROYECTO:

PROYECTO DE DISEÑO DE UNA LÍNEA DE PRODUCCIÓN DE HONGOS Y BACTERIAS PARA LA MEJORA DE SUELOS FORESTALES

PLANO:

PLANO DE DETALLE DEL ETIQUETADO ESTANDAR, DIMENSIONES Y DISPOSICIÓN

PROMOTOR:

IDForest-Biotecnología Forestal Aplicada S.L.

NÚMERO:

5.1

EMPLAZAMIENTO:

Palencia

AUTOR Y FECHA:

Grado en Ingeniería Forestal y del Medio Natural
En Valladolid a 6 de marzo de 2020
FDO. Rodrigo Herrera Sanz

ESCALA:

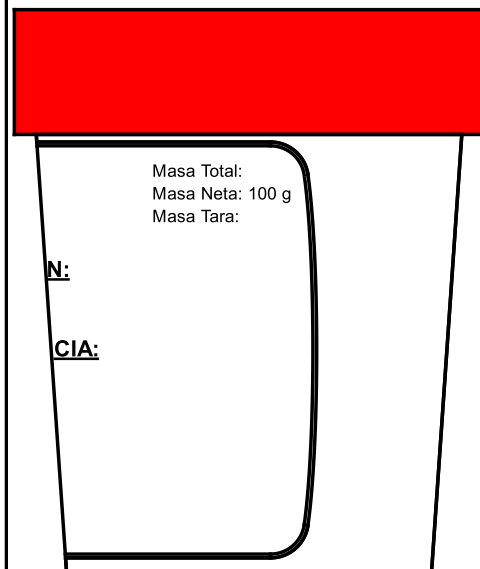
2:1

Diseño Formato Embalaje

Planta



Perfil



Alzado



Perfil



MATERIALES Y DIMENSIONES:

Material tapa:	Polietileno
Material principal:	Polipropileno
Altura total:	74,3 mm
Diámetro mayor:	56,3 mm
Diámetro menor:	48,3 mm
Diámetro tapa:	62,1 mm



Universidad de Valladolid

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍAS AGRARIAS



PROYECTO:

PROYECTO DE DISEÑO DE UNA LÍNEA DE PRODUCCIÓN DE HONGOS Y BACTERIAS PARA LA MEJORA DE SUELOS FORESTALES

PLANO:

PLANO DETALLE DEL DISEÑO DE EMBALAJE TIPO

PROMOTOR:

IDForest-Biotecnología Forestal Aplicada S.L.

NÚMERO:

5.2

EMPLAZAMIENTO:

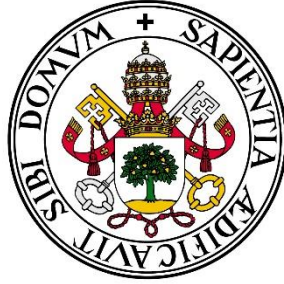
Palencia

AUTOR Y FECHA:

Grado de Ingeniería Forestal y del Medio Natural
En Valladolid a 17 de Mayo de 2020.
FDO. Rodrigo Herrera Sanz

ESCALA:

1:1



Universidad de Valladolid

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍAS AGRARIAS

Grado en Ingeniería Forestal y del Medio Natural

Proyecto de diseño de línea de producción de bacterias y hongos para la mejora de suelos forestales.

DOCUMENTO N°3. PLIEGO DE CONDICIONES

Alumno: Rodrigo Herrera Sanz

Tutor: María Elena Hidalgo Rodríguez

Cotutor: Joaquín Navarro Hevia

Director: Jaime Olaizola Suárez

Índice del Pliego de condiciones

TÍTULO I. DISPOSICIONES GENERALES	1
Artículo 1. Objeto del pliego	1
Artículo 2. Alcance del pliego	1
Artículo 3. Promoción del proyecto	1
Artículo 4. Proyección del proyecto	1
Artículo 5. Ejecución del proyecto	2
Artículo 6. Dirección del proyecto	3
TÍTULO II. PLIEGO DE CONDICIONES DE ÍNDOLE TÉCNICA	3
CAPÍTULO. I. CONDICIONES DE ÍNDOLE TÉCNICA EN LOS TRABAJOS PREVIOS	3
EPÍGRAFE 1.1 CONDICIONES DE ÍNDOLE TÉCNICA EN LA IDENTIFICACIÓN GENÉTICA	3
Artículo 7. Extracción del ADN	3
Artículo 8. Amplificación del ADN	4
Artículo 9. Electroforesis	5
Artículo 10. Secuenciación	6
EPÍGRAFE 1.2 CONDICIONES DE ÍNDOLE TÉCNICA DE LA PRUEBA DE PRODUCCIÓN EN ESTADO SÓLIDO DE <i>Trichoderma spp</i>	6
Artículo 11. Protocolo de extracción en estado sólido	6
CAPÍTULO. II. CONDICIONES DE ÍNDOLE TÉCNICA DE LA LÍNEA DE PRODUCCIÓN	7
EPÍGRAFE 2.1 CONDICIONES DE ÍNDOLE TÉCNICA DE LA FASE I	7
Artículo 12. Esterilización	7
Artículo 13. Producción del medio de cultivo	7
Artículo 14. Formulación del inóculo	7

EPÍGRAFE 2.2 CONDICIONES DE ÍNDOLE TÉCNICA DE LA FASE II	8
Artículo 15. Producción en masa	8
EPÍGRAFE 2.3 CONDICIONES DE ÍNDOLE TÉCNICA DE LA FASE III	9
Artículo 16. Formulación	9
Artículo 17. Empaquetado	9
Artículo 18. Conservación	10
Artículo 19. Otros materiales	10
CAPÍTULO. III. CONDICIONES DE ÍNDOLE TÉCNICA DE SEGURIDAD Y SALUD	11
EPÍGRAFE 3.1 CONDICIONES DE ÍNDOLE TÉCNICA DE LA SEGURIDAD	11
Artículo 20. Incendios	11
Artículo 21. Peligros	11
EPÍGRAFE 3.2 CONDICIONES DE ÍNDOLE TÉCNICA DE LA SALUD	11
Artículo 22. Salud	11
TÍTULO III. PLIEGO DE CONDICIONES DE ÍNDOLE FACULTATIVA	12
EPÍGRAFE. 1. OBLIGACIONES Y DERECHOS DEL CONTRATISTA	12
Artículo 23. Responsabilidades del Contratista	12
Artículo 24. Residencia del Contratista	12
Artículo 25. Interpretaciones, aclaraciones y modificaciones del proyecto	12
Artículo 26. Despido por insubordinación incapacidad y mala fe	12
EPÍGRAFE. 2. PRESCRIPCIONES GENERALES RELATIVAS A TRABAJOS, MATERIALES Y MEDIOS AUXILIARES	12
Artículo 27. Comienzo, ritmo y orden de los trabajos	12
Artículo 28. Ampliaciones y prórrogas por fuerza mayor	13

Artículo 29. Condiciones generales de ejecución de los trabajos	13
Artículo 30. Trabajos defectuosos	13
Artículo 31. Materiales no utilizables o defectuosos	13
EPÍGRAFE. 3. RECEPCIÓN Y LIQUIDACIÓN	14
Artículo 32. Recepciones provisionales	14
Artículo 33. Recepción definitiva	14
Artículo 34. Liquidación final	15
TÍTULO IV. PLIEGO DE CONDICIONES DE ÍNDOLE ECONÓMICA	15
EPÍGRAFE. 1. BASE FUNDAMENTAL	15
Artículo 35. Base fundamental	15
EPÍGRAFE. 2. PRECIOS Y REVISIONES	15
Artículo 36. Precios de unidades de obra	15
Artículo 37. Precios contradictorios	15
EPÍGRAFE 3. VALORACIÓN Y ABONO DE LOS TRABAJOS	16
Artículo 38. Certificaciones	16
Artículo 39. Abonos por trabajos especiales no contratados	16
Artículo 40. Suspensión por retraso de pagos	16
Artículo 41. Indemnización por suspensión o retraso en los trabajos	16
Artículo 42. Indemnización por daños de fuerza mayor al Contratista	17
TÍTULO III. PLIEGO DE CONDICIONES DE ÍNDOLE LEGAL	17
EPÍGRAFE. 1. EPÍGRAFE ÚNICO	17
Artículo 43. Trabajos a los que se refiere el contrato	17
Artículo 44. Documentos del proyecto	17
Artículo 45. Rescisión del contrato	18

TÍTULO I. DISPOSICIONES GENERALES

Artículo 1. Objeto del pliego

El Pliego de Condiciones es el documento contractual que se va a centrar en la definición y clarificación de los aspectos técnicos, facultativos, económicos y legales que son necesarios para el desarrollo del presente proyecto, “Proyecto de diseño de línea de producción de bacterias y hongos micorrízicos para la mejora de suelos forestales”.

Su aplicación será obligada en el desarrollo de los trabajos previos y en la definición de la línea de producción, procesos detallados en los siguientes documentos: I. Memoria, II. Planos, IV. Mediciones y V. Presupuesto.

En el caso de la existencia de contradicciones o descoordinaciones entre el documento II. Planos, mencionado anteriormente y el presente documento, será el documento III. Pliego de Condiciones el que prevalezca, dando por válido lo que este establece.

Artículo 2. Alcance del pliego

Todo lo establecido en el presente Pliego de condiciones, será de aplicación obligada únicamente en el presente proyecto, denominado “Proyecto de diseño de una línea de producción de hongos y bacterias micorrízicos para la mejora de los suelos forestales”, llevado a cabo en el municipio de Palencia (Palencia).

Artículo 3. Promoción del proyecto

La promoción del presente proyecto es realizada por el interviniente conocido como Promotor, entendiéndose este como personas físicas o jurídicas, entidades privadas o públicas u ONGs que, con el propósito de dar solución a un problema o para satisfacer una necesidad, impulsa, programa y financia el proyecto, cumpliendo con las siguientes funciones:

- Ostentar la titularidad del terreno y/o instalación en la que se desarrolla el proyecto.
- Facilitar la documentación necesaria para el diseño y consecución del proyecto.
- Autorizar posibles modificaciones del proyecto.
- Gestionar licencias y autorizaciones administrativas necesarias conforme a la ley vigente.
- Suscripción de seguros obligatorios.
- Realizar los pagos correspondientes en las distintas fases del proyecto.

Artículo 4. Proyección del proyecto

El Proyectista es el agente que, por encargo del promotor, redacta el proyecto. Se entiende como Proyectista a la persona y/o colectivo que cumple con esta función.

En el caso en el que otros técnicos redacten proyectos parciales o partes complementarias del proyecto principal, siempre en coordinación con el autor de éste, cada Proyectista asumirá la titularidad de su proyecto. Las obligaciones del Proyectista son las siguientes:

- Estar en posesión de la titulación académica necesaria y habilitante para desempeñar las funciones de Ingeniero, Ingeniero técnico, Arquitecto, Arquitecto técnico y/o Técnico superior, según el caso, además de cumplir con otras condiciones exigibles en el desempeño de su labor. En el caso de ser una persona jurídica, el proyectista debe designar un técnico redactor del proyecto que sí posea la titulación profesional habilitante.
- Redactar el proyecto con sujeción a la normativa vigente y a lo establecido en el contrato y entregarlo, con los visados que es su caso fueran preceptivos.
- Acordar con el promotor la contratación de colaboradores parciales.

Artículo 5. Ejecución del proyecto

El agente encargado de la ejecución del proyecto es el Proveedor. Como Proveedor se entiende al agente que asume, contractualmente con el promotor, el compromiso de producir y suministrar los equipos que forman parte del proyecto. Para ello utilizará e invertirá medios humanos y materiales, propios o ajenos siempre con el objetivo de satisfacer las necesidades del cliente y conforme a lo establecido en el proyecto y contrato. Las obligaciones del contratista son las siguientes:

- Producción suministro e instalación de los equipos contratados conforme a lo estipulado en el contrato y a la legislación aplicable, siguiendo las instrucciones del director de obra, a fin de alcanzar la calidad exigida en el proyecto.
- Tener la titulación o capacitación profesional que habilita para el cumplimiento de las condiciones exigibles para actuar como Proveedor.
- Designar al jefe de obra que asumirá la representación técnica del Proveedor en esta y que, por su titulación o experiencia, deberá tener la capacitación adecuada de acuerdo con las características y la complejidad de la obra.
- Asignar a la obra los medios humanos y materiales que su importancia requiera.
- Formalizar las subcontrataciones de determinadas partes o instalaciones de la obra dentro de los límites establecidos en el contrato.
- Firmar el acta de comienzo y el acta de recepción del proyecto.

- Facilitar al director de obra los datos necesarios para la elaboración de la documentación de la obra ejecutada.

Artículo 6. Dirección del proyecto

La dirección del proyecto corresponde al Director de obra, entendiendo este como el agente que, formando parte de la dirección facultativa, dirige el desarrollo de la obra en los aspectos técnicos, estéticos, urbanísticos y medioambientales, de conformidad con el proyecto que la define, la licencia de edificación y demás autorizaciones preceptivas y las condiciones del contrato, con el objeto de asegurar su adecuación al fin propuesto.

Podrán dirigir las obras de los proyectos parciales otros técnicos, bajo la coordinación del director de obra.

Las obligaciones del Director de obra son las siguientes:

- Estar en posesión de la titulación académica y profesional habilitante de arquitecto, arquitecto técnico, ingeniero o ingeniero técnico, según corresponda y cumplir las condiciones exigibles para el ejercicio de la profesión. En caso de personas jurídicas, designar al técnico director de obra que tenga la titulación profesional habilitante.
- Resolver las contingencias que se produzcan en la obra y consignar en el Libro de Órdenes y Asistencias las instrucciones precisas para la correcta interpretación del proyecto.
- Verificar el replanteo y la adecuación de la cimentación y de la estructura proyectadas a las características geotécnicas del terreno.
- Elaborar, a requerimiento del promotor o con su conformidad, eventuales modificaciones del proyecto, que vengan exigidas por la marcha de la obra siempre que las mismas se adapten a las disposiciones normativas contempladas y observadas en la redacción del proyecto
- Suscribir el acta de replanteo o de comienzo de obra y el certificado final de obra, así como conformar las certificaciones parciales y la liquidación final de las unidades de obra ejecutadas, con los visados que en su caso fueran preceptivos.
- Elaborar y suscribir la documentación de la obra ejecutada para entregarla al promotor, con los visados que en su caso fueran preceptivos.

TÍTULO II. PLIEGO DE CONDICIONES DE ÍNDOLE TÉCNICA

CAPÍTULO. I. CONDICIONES DE ÍNDOLE TÉCNICA EN LOS TRABAJOS PREVIOS

EPÍGRAFE 1.1 CONDICIONES DE ÍNDOLE TÉCNICA EN LA IDENTIFICACIÓN GENÉTICA

Artículo 7. Extracción del ADN

El proceso de extracción del material genético para la identificación del género, especie y cepa del organismo con el que se trabaja, se realizará únicamente en los casos en los que sea necesaria la consecución de esta técnica y siguiendo los protocolos explicados

Alumno: Rodrigo Herrera Sanz

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (CAMPUS DE PALENCIA). E.T.S. de Ingenierías Agrarias

Titulación: Grado en Ingeniería Forestal y del Medio Natural

en el anejo III. La extracción del ADN será llevada a cabo por personal competente, con formación oficial, suficiente y habilitante para estas tareas. Se considerará lo siguiente:

-Materiales principales a utilizar:

- Kit de extracción E.Z.N.A.®Plant DNA Kit con 200 preparaciones equipado con HiBind®DNA Mini Column y mezclas tampón, utilizables en certificaciones.
- Tubos Eppendorf estériles de 5 ml de volumen.
- Centrífuga de laboratorio de 10000 rpm.
- Termostatzado.

-Materiales secundarios:

- Morteros.
- Micropipetas 1-100 µl.
- Puntas de micropipeta, de volumen adaptado a las necesidades del momento.
- Escalpelos.

- Equipo de protección:

- Guantes de látex.
- Bata de laboratorio.

-Previamente a la realización de la extracción se revisará el protocolo a seguir y se asegurará que el material necesario se encuentra disponible y preparado para su utilización.

-Al finalizar la extracción, el material genético resultante se conservará en el congelador hasta su uso en el proceso de amplificación, si este no se lleva a cabo justo después de la extracción. De la misma forma todos los utensilios y equipos utilizados serán esterilizados (en caso de ser necesario) y se guardarán y almacenarán en condiciones correctas hasta su próximo uso, siguiendo las normas del laboratorio y las recomendaciones de los fabricantes.

Artículo 8. Amplificación del ADN

La amplificación del material genético se llevará a cabo tras la extracción del ADN (en aquellos organismos que lo requieran), tal y como se explica en el anejo III de este mismo proyecto. Será llevado a cabo por profesionales habilitados con la titulación y conocimientos necesarios para realizar este tipo de trabajos y en un laboratorio registrado y con permiso para la consecución de estas tareas. Se considerará lo siguiente:

-Materiales principales a utilizar:

- Kit de amplificación ilustra PuReTaq Ready-To-Go PCR Beads de 96 preparaciones.
- *Primer* ITS 4, 5 µl.
- *Primer* ITS 1, 5 µl.
- Termociclador.

-Materiales secundarios:

- Micropipetas 1-100 μ l.
- Puntas de micropipeta, de volumen adaptado a las necesidades del momento.
- Vortex.

- Equipo de protección:

- Guantes de látex.
- Bata de laboratorio.

-Previamente al inicio de la técnica y a la preparación de las disoluciones necesarias, se prepararán los materiales a utilizar y se realizará un repaso del protocolo a seguir.

-Al finalizar la técnica de amplificación del ADN, se procederá a la conservación del material obtenido a baja temperatura en congelador, siempre y cuando no se lleve a cabo la electroforesis y/o secuenciación del material genético al acabar la PCR. También se deberán esterilizar y almacenar los utensilios y reactivos utilizados, siguiendo las normas del laboratorio y las recomendaciones de los fabricantes.

Artículo 9. Electroforesis

La técnica de electroforesis será realizada siguiendo el protocolo explicado en el anejo III del presente proyecto. Será llevada a cabo por profesionales habilitados con la titulación y conocimientos necesarios para realizar este tipo de trabajos y en un laboratorio registrado y con permiso para la consecución de estas tareas. Se considerará lo siguiente:

- Materiales principales a utilizar:

- Cubeta de electroforesis y fuente de alimentación de 100 V.
- Agarosa 1,50 g.
- Colorante de ADN "Midori green" 15 μ l.
- TAE *buffer* 10X 25 ml.
- *Loading buffer* 8 μ l.
- *Ladder* 100 bp DNA 5 μ l.

- Materiales secundarios:

- Micropipeta 1-100 μ l.
- Puntas de micropipeta, de volumen adaptado a las necesidades del momento.

- Equipo de protección:

- Guantes de látex.
- Bata de laboratorio.
- Gafas de protección.

-Previamente al inicio de la técnica se verificará que todos los materiales y equipos necesarios se encuentran disponibles, esterilizados y preparados para su uso.

-Al finalizar la experiencia y obtener los resultados, se esterilizarán todos los materiales y equipos que así lo requieran y se guardarán y almacenarán siguiendo las normas establecidas por el laboratorio y los fabricantes

Alumno: Rodrigo Herrera Sanz

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (CAMPUS DE PALENCIA). E.T.S. de Ingenierías Agrarias

Titulación: Grado en Ingeniería Forestal y del Medio Natural

Artículo 10. Secuenciación

La secuenciación del material genético de las muestras con las que se trabaja y de las que se pretende determinar el género, especie y cepa, será llevada a cabo por una o varias empresas registradas, dedicadas a estos trabajos y con experiencia previa demostrada. Esta debe utilizar equipos profesionales, reconocidos y regulados. Los profesionales que lleven a cabo esta tarea de secuenciación deben encontrarse en posesión de los títulos y certificados necesarios para llevar a cabo este tipo de trabajos y deben encontrarse habilitados por las autoridades competentes.

EPÍGRAFE 1.2 CONDICIONES DE ÍNDOLE TÉCNICA DE LA PRUEBA DE PRODUCCIÓN EN ESTADO SÓLIDO DE *Trichoderma spp*

Artículo 11. Protocolo de extracción en estado sólido

El protocolo de producción en estado sólido de *Trichoderma spp.* será diseñado tras la recopilación, análisis y contraste de la información encontrada en referencias bibliográficas publicadas en medios fiables. Se adaptará para poder realizarlo con los materiales disponibles en laboratorio y llevar a cabo el análisis en las mismas instalaciones.

Los resultados serán analizados por personal competente, habilitado y con formación suficiente para llevar a cabo este tipo de tareas, utilizando material esterilizado, calibrado y en buen estado. Se considerará lo siguiente:

-Materiales principales a utilizar:

- Arroz, trigo, cebada y centeno como medios de cultivo.
- Bolsas de plástico sellables.
- Selladora.
- Microscopio óptico de hasta 40x aumentos.
- Cámara de Neubauer de 0,025 mm³ de volumen.
- Campana de gases.
- Balanza de laboratorio con ± 1 mg de precisión.
- Porta-objetos y cubre-objetos.

-Materiales secundarios:

- Tubos de ensayo.
- Micropipeta 1-100 μ l.
- Puntas de micropipeta, de volumen adaptado a las necesidades del momento.
- Mechero Bunsen.
- Agua destilada.

-Equipo de protección:

- Guantes de látex.
- Bata de laboratorio.

-Tras la realización de la experiencia se realizará el cálculo de los resultados obtenidos, los cuales se tomarán como referencia para posteriores fases del proyecto.

Alumno: Rodrigo Herrera Sanz

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (CAMPUS DE PALENCIA). E.T.S. de Ingenierías Agrarias

Titulación: Grado en Ingeniería Forestal y del Medio Natural

-Una vez finalizada la prueba de producción en estado sólido, se esterilizarán y almacenarán los equipos, materiales y reactivos utilizados, siguiendo las normas del laboratorio y las recomendaciones de los fabricantes.

CAPÍTULO. II. CONDICIONES DE ÍNDOLE TÉCNICA DE LA LÍNEA DE PRODUCCIÓN

EPÍGRAFE 2.1 CONDICIONES DE ÍNDOLE TÉCNICA DE LA FASE I

Artículo 12. Esterilización

Las tareas de esterilización de materiales y equipos se llevarán a cabo mediante un esterilizador autoclave. El modelo elegido, el autoclave Celitron Azteca A-456, producido por la empresa Celitron. Presenta las siguientes características:

- Material: Acero inoxidable 316L en la cámara interior. Acero 304L en las tuberías y el exterior.
- Volumen de la cámara: 180 l
- Altura cámara: 500 mm
- Anchura cámara: 500 mm
- Fondo cámara: 735 mm
- Altura total: 1810 mm
- Anchura total: 970 mm
- Fondo total: 1010 mm
- Potencia eléctrica: 20 kw
- Peso estimado: 550 kg

Artículo 13. Producción del medio de cultivo

La producción del medio de cultivo se llevará a cabo en equipos diseñados para este tipo de tareas. Presentan las siguientes características:

- Material: Acero inoxidable AISI 304.
- Anchura total: 1000 mm
- Altura total: 850 mm
- Fondo total: 700 mm
- Anchura cuba: 860 mm
- Altura cuba: 500 mm
- Fondo cuba: 380 mm

Artículo 14. Formulación del inóculo

Para la formación del inóculo inicial y para ambas líneas, tanto para *Trichoderma spp.*, como para *Pseudomonas spp.*, se requiere la utilización de un biorreactor de pequeño tamaño con las características expuestas en el anejo IV. El modelo de biorreactor elegido es el F1 MB de 3 litros de capacidad, producido por la empresa Bionet. Presenta las siguientes características:

- Materiales: El tanque se compone de cristal borosilicato esterilizable.
Los componentes en contacto con el tanque son de acero inoxidable A316L y el resto de componentes son de acero A304.
- Volumen total: 4,3 l
- Volumen máximo de trabajo: 3 l
- Volumen mínimo de trabajo: 0,65 l
- Nº puertos: 12
- Altura total: 840 mm
- Anchura total: 935 mm
- Fondo total: 500 mm
- Altura tanque: 359 mm
- Diámetro exterior tanque: 175 mm
- Diámetro interior tanque: 156 mm

EPÍGRAFE 2.2 CONDICIONES DE ÍNDOLE TÉCNICA DE LA FASE II

Artículo 15. Producción en masa

La producción en masa de *Pseudomonas spp.* y *Trichoderma spp.* se realizará en los biorreactores F2 MB de 30 litros y F3 MB de 100 litros, respectivamente. Estos presentan las características siguientes:

- Biorreactor F2 MB de 30 litros:
 - Materiales: Tanque compuesto de acero inoxidable AISI 316L. Acero inoxidable AISI 304 en el resto de los componentes.
 - Volumen total: 44 l
 - Volumen máximo de trabajo: 30 l
 - Volumen mínimo de trabajo: 7 l
 - Nº de puertos: 20
 - Altura total: 1962 mm
 - Anchura total: 1100 mm
 - Fondo total: 700 mm
 - Altura tanque: 801 mm
 - Diámetro externo tanque: 273 mm
 - Potencia eléctrica: 5,5 kw

- Biorreactor F3 MB de 100 litros:
 - Materiales: Tanque compuesto de acero inoxidable AISI 316L. Acero inoxidable AISI 304 en el resto de los componentes.
 - Volumen total: 143 l
 - Volumen máximo de trabajo: 100 l
 - Volumen mínimo de trabajo: 25 l
 - Nº de puertos: 24
 - Altura total: 2277,3 mm
 - Anchura total: 1500 mm
 - Fondo total: 830 mm
 - Altura tanque: 1206 mm

- Diámetro exterior tanque: 406 mm
- Potencia eléctrica: 6,5 kw

EPÍGRAFE 2.3 CONDICIONES DE ÍNDOLE TÉCNICA DE LA FASE III

Artículo 16. Formulación

El liofilizado del producto obtenido se llevará a cabo en el sistema de liofilización Kemolo FD-50, producido por la empresa Kemolo. Previo a su uso, este sistema debe ser importado, instalado y probado en las instalaciones del cliente.

Presenta las siguientes características:

- Dimensiones de la cámara:
 - Alto: 2000 mm
 - Ancho: 1100 mm
 - Largo: 2600 mm
- Dimensiones de los estantes:
 - Ancho: 700 mm
 - Largo: 1300 mm
- Masa estimada: 2000 kg
- Área de instalación: 9 m²
- Material: SUS304
- Temperatura del condensador de vapor: -45 °C
- Temperatura de los estantes: -30 °C a 60 °C
- Presión mínima: 10 Pa
- Velocidad de vacío (1 atm a 0,001 atm): ≤30 min
- Refrigerante: R404A
- Sistema de enfriamiento: Por aire
- Potencia eléctrica: 10 kw.

Para la consecución de la formulación, se utilizarán bandejas Teclen® Lyoprotect® LPMU-V2740B-WS, reutilizables, que presentan las características siguientes:

- Volumen máximo: 1800 ml
- Volumen mínimo: 400 ml
- Largo: 400 mm
- Ancho: 270 mm
- Alto: 43 mm
- Material: Acero inoxidable AISI 316 L

Artículo 17. Empaquetado

Tras la formulación se procederá al empaquetado del producto en su embalaje. Este se compone de frascos trapezoidales de polipropileno estériles de 150 ml de capacidad. Sus medidas son las siguientes:

- Altura: 7,43 cm
- Diámetro mayor: 5,53 cm

- Diámetro menor: 4,83 cm
- Anchura de la tapa: 6,21 cm

Artículo 18. Conservación

La conservación del producto, una vez formulado y empaquetado, así como la conservación de los materiales que requieran condiciones de humedad y temperatura bajas, se llevará a cabo en una cámara frigorífica. El modelo a utilizar es el modelo de Cámara frigorífica polar max 176x136 mm, producida por la compañía Impafri. Esta presenta las características siguientes:

- Estructura rectangular con techo y suelo.
- Altura: 228 cm
- Anchura: 176 cm
- Fondo: 136 cm
- Sistema de refrigeración: MCV-NY-0015
- Espesor del aislamiento: 8 cm

En su interior lleva incorporada una estantería con cuatro niveles y de dimensiones 176 cm de alto y 37 cm de ancho.

Artículo 19. Otros materiales

Los procesos de esterilización de los medios de cultivo y de las soluciones crioprotectoras se van a completar en garrafas de plástico esterilizables en autoclave Thermo Scientific™ Nalgene™. Presentan las características siguientes:

- Altura: 389 mm
- Diámetro externo: 250 mm
- Volumen métrico: 12 l
- Capacidad: 10 l
- Tamaño de tapón: 83B
- Material: Polipropileno esterilizable
- Presenta conformidad alimentaria y farmacéutica.

El movimiento de materiales y equipos se va a realizar mediante carros de servicio con las siguientes características:

- Material: Acero inoxidable AISI 304
- Capacidad de carga: 100 kg
- Nº niveles: 2
- Altura: 950 mm
- Anchura: 890 mm
- Fondo: 590mm

El reciclado de los residuos generados se completará gracias a la adquisición y suministro de contenedores destinados para este fin. Estos presentan las características siguientes:

- Capacidad: 770 l
- Altura: 1365 mm
- Ancho: 1373 mm
- Fondo: 780 mm
- Masa en vacío: 42 kg
- Capacidad de carga máxima: 360 kg
- Nº ruedas: 4, 2 de ellas con freno
- Diámetro de ruedas: 200 mm

Los trabajadores dispondrán de una caseta modular, habilitada como vestuario, con un banco de madera y taquillas individuales. Esta presenta las siguientes características:

- Longitud exterior: 3280 mm
- Anchura exterior: 3000 mm
- Longitud interior: 3170 mm
- Anchura interior: 2890 mm
- Peso: 1200 kg
- Altura: 2500 mm

CAPÍTULO. III. CONDICIONES DE ÍNDOLE TÉCNICA DE SEGURIDAD Y SALUD

EPÍGRAFE 3.1 CONDICIONES DE ÍNDOLE TÉCNICA DE LA SEGURIDAD

Artículo 20. Incendios

La protección contra incendios se compone de medidas activas y señalizaciones. Las medias activas se componen de extintores de nieve carbónica CO₂ de 2 kg de agente extintor, con vaso difusor y que siguen la normativa UNE 23110.

Por su parte la señalización se compone de un bloque de alumbrado de emergencia, incandescente IP65 con lámpara de 8 w y autonomía de 3 horas.

Artículo 21. Peligros

Se instalarán carteles indicativos de riesgo que deben cumplir la normativa UNE 81 501-81, UNE 1-115-85, UNE 23-033 y la normativa ISO 7010

EPÍGRAFE 3.2 CONDICIONES DE ÍNDOLE TÉCNICA DE LA SALUD

Artículo 22. Salud

Se llevará a cabo la adquisición e instalación de un botiquín de primeros auxilios que debe incluir:

- Desinfectantes y antisépticos autorizados
- Gasas estériles
- Vendas
- Algodón hidrófilo

- Esparadrapo
- Apósitos adhesivos
- Tijeras
- Pinzas
- Guantes desechables

TÍTULO III. PLIEGO DE CONDICIONES DE ÍNDOLE FACULTATIVA

EPÍGRAFE. 1. OBLIGACIONES Y DERECHOS DEL CONTRATISTA

Artículo 23. Responsabilidades del Proveedor

De forma general el Proveedor será el encargado de producir, transportar, instalar y probar el correcto funcionamiento, en las instalaciones del cliente, de los equipos y la maquinaria que componen el proyecto. Esta norma se aplicará de forma general con los distintos proveedores, no respetándose únicamente en aquellos casos en los que el contrato de compra indica otras condiciones.

Artículo 24. Residencia del Contratista

Debido a la naturaleza de las obras, el Proveedor no estará obligado a residir en una zona cercana al de la realización del proyecto. Sin embargo, el técnico/trabajador encargado de supervisar y llevar a cabo los trabajos de transporte, instalación y prueba de los equipos, será considerado como representante del Proveedor y, por tanto, el responsable de llevar a cabo estas tareas conforme a lo anunciado y contratado. Tras la instalación, en el caso de detectarse problemas de fábrica en los equipos o causados en el proceso de transporte e instalación, será el Proveedor el considerado como responsable.

Artículo 25. Interpretaciones, aclaraciones y modificaciones del proyecto

El Proveedor recibirá una solicitud en la que se detallarán de forma precisa las características y cualidades de los equipos a adquirir, expuestos en este mismo documento. PLIEGO DE CONDICIONES DE ÍNDOLE TÉCNICA. En caso de surgir cualquier duda sobre los equipos a producir, el contratista debe contactar con el director de obra para aclararlas y/o para sugerir modificaciones que faciliten su trabajo. Estas sugerencias serán discutidas con el Promotor y Proyectista, los cuales decidirán si se aplican o no. En ningún caso se permitirá la entrega e instalación de equipos que no cumplan con lo contratado y aprobado.

Artículo 26. Despido por insubordinación, incapacidad y mala fe

En el caso en el que se considere y demuestre que el Proveedor no ha cumplido con lo establecido en el proyecto y en el contrato, o que lo haya hecho de forma parcial, se rescindirá el contrato con él, el cual deberá devolver lo ingresado por sus servicios, en caso de habersele abonado cualquier cuantía.

EPÍGRAFE. 2. PRESCRIPCIONES GENERALES RELATIVAS A TRABAJOS, MATERIALES Y MEDIOS AUXILIARES

Artículo 27. Comienzo, ritmo y orden de los trabajos

Los trabajos, entendidos como la producción, construcción, entrega, instalación y prueba de los equipos adquiridos, debe realizarse dentro del periodo de tiempo otorgado a los fabricantes para la consecución de sus funciones. Esta información se encuentra en el cronograma de la actividad perteneciente al anejo VI: PROGRAMACIÓN PARA LA EJECUCIÓN DEL PROYECTO.

Artículo 28. Ampliaciones y prórrogas por fuerza mayor

En casos especiales en los que el Proveedor exprese la imposibilidad de finalizar los trabajos en el periodo de tiempo establecido, debido a situaciones especiales, imprevistos o por fuerza mayor, siempre debidamente acreditadas, se otorgará una ampliación máxima de la finalización de los trabajos de quince (15) días, tras los cuales los trabajos deberán haberse completado. En caso contrario, el contrato será anulado y el Proveedor deberá reembolsar lo cobrado hasta el momento.

Artículo 29. Condiciones generales de ejecución de los trabajos

El Proveedor dispondrá de una copia del documento III. PLIEGO DE CONDICIONES, en el que en el apartado PLIEGO DE CONDICIONES DE ÍNDOLE TÉCNICA, se detallan las características de los equipos y materiales a entregar. De esta forma, el Proveedor debe cumplir con las determinaciones expuestas en este documento. En caso de no cumplir con lo establecido en el documento, el Proveedor será el único responsable de cualquier fallo, avería o accidente que acontezca una vez entregados los equipos al promotor, haciéndose cargo de la sustitución de equipos, reparación y/o indemnización del promotor y trabajadores, en caso de accidente, baja laboral o muerte.

Artículo 30. Trabajos defectuosos

Previamente a la instalación y, durante la prueba durante la de los equipos, se llevará a cabo una revisión exhaustiva de los trabajos realizados por el Director de Obra y su equipo. En el caso de detectarse defectos en la maquinaria, su funcionamiento y/o en su instalación, no siguiendo lo establecido en el Documento III. PLIEGO DE CONDICIONES, este tendrá la autoridad de exigir la reparación de los equipos insitu, su reinstalación o la devolución de estos, dependiendo del grado de la incidencia, haciéndose el Proveedor responsable de los costes originados. Una vez entregados y aceptados los equipos, el contratista se encontrará libre de toda responsabilidad, exceptuando los casos considerados en el Artículo 29 de este mismo documento, en el caso en el que se pueda demostrar que los fallos han sido originados por defectos y vicios intrínsecos de la maquinaria, al no seguir lo establecido en el Documento III. PLIEGO DE CONDICIONES.

Artículo 31. Materiales no utilizables o defectuosos

El Proveedor únicamente podrá utilizar los materiales establecidos en el Documento III. PLIEGO DE CONDICIONES TÉCNICAS, es decir, aquellos homologados y autorizados

para la consecución de los trabajos recogidos en el presente proyecto. En el caso de duda sobre materiales, el Proveedor deberá transmitirla al Director de Obra, el cual la resolverá, consultando al Proyectista (en el caso de ser otra persona), si es necesario. En el caso de modificación de los materiales, el Proyectista abrirá un acta en el que se refleje de forma oficial la modificación.

Si el Proveedor utilizara materiales no incluidos en el TÍTULO II. PLIEGO DE CONDICIONES DE ÍNDOLE TÉCNICA o en las actas de modificación, este deberá retirarlos y sustituirlos por los que sí se incluyen en los documentos anteriores, una vez detectados por el Director de Obra. En caso de no ser detectados antes de la entrega y aceptación, se aplicará el Artículo 29.

EPÍGRAFE. 3. RECEPCIÓN Y LIQUIDACIÓN

Artículo 32. Recepciones provisionales

Una vez realizada la instalación y prueba de los equipos y el Director de Obra y el Promotor hayan dado su visto bueno a los trabajos realizados, certificando, en la medida de lo posible, la buena calidad de la instalación y el buen funcionamiento de los equipos, se firmará un acta de recepción provisional y el periodo de garantía comenzará a correr. Este variará con respecto a cada equipo y se establece en el momento de contratación. Estos ascienden:

- Autoclave Celitron A-456: 1 año.
- Biorreactor Bionet F1 MB-3: 1 año.
- Biorreactor BionEt F2 MB-30: 1 año.
- Biorreactor Bionet F3 MB-100: 1 año.
- Liofilizador Kemolo FD-50: 2 años.
- Cámara frigorífica polar max 176x136 Impafri: 2 años.
- Fregadero industrial de acero inoxidable: 6 meses.
- Bandejas Teclen® Lyoprotect® LPMU-V2740B-WS: 3 meses.
- Carros de servicio: Sin garantía.
- Garrafas autoclavables Thermo Scientific™ Nalgene™: Sin garantía.
- Contenedor de basuras 770 litros: 2 años.

La recepción provisional durará hasta la consecución del primer ciclo productivo, tras el cual, se realizará una revisión de los equipos e instalaciones, los cuales deben presentar las mismas características que al inicio de la recepción provisional. En caso contrario, el Director de Obra comunicará al Proveedor los fallos detectados y se le otorgará un periodo de tiempo, acordado por ambas partes, para subsanarlos.

Artículo 33. Recepción definitiva

Una vez completado este periodo de prueba satisfactoriamente, se realizará la aceptación y recepción final de los equipos, mediante la firma de un acta de recepción final. Tras la aceptación, en el caso de detectarse vicios o defectos (tarea que corresponde al Director de Obra,) producidos por la utilización de materiales no autorizados o por la transgresión de lo estipulado en el TÍTULO II. PLIEGO DE CONDICIONES TÉCNICAS, el Proveedor seguirá siendo responsable de estos equipos

y de las consecuencias que su utilización acarrea (accidentes, daños en instalaciones, etc...).

De esta forma el Proveedor deberá subsanar estos fallos en un periodo de tiempo establecido en acuerdo con el Promotor y el Director de Obra.

Artículo 34. Liquidación final

En el caso de no detectarse fallos o vicios tras el periodo de prueba y realizarse la aceptación final de los equipos, se llevará a cabo la liquidación final. En ella se incluirá lo establecido en el documento V. PRESUPUESTO más las modificaciones llevadas a cabo con el consentimiento del Proyectista y el Promotor.

En el caso de haberse detectado fallos y haber tenido que llevar a cabo reparaciones, reinstalaciones y/o sustituciones, el Proveedor no percibirá ningún aumento por ello, dado que se considera responsable de estos gastos añadidos.

TÍTULO IV. PLIEGO DE CONDICIONES DE ÍNDOLE ECONÓMICA

EPÍGRAFE. 1. BASE FUNDAMENTAL

Artículo 35. Base fundamental

Una vez finalizada su tarea, el Proveedor cobrará por los trabajos completados acorde a lo establecido en el Documento III. PLIEGO DE CONDICIONES. El Promotor abonará lo establecido por el contrato firmado por ambas partes.

EPÍGRAFE. 2. PRECIOS Y REVISIONES

Artículo 36. Precios de unidades de obra

En el Documento V. PRESUPUESTOS, se incluyen los precios de las unidades de obra; todos los materiales y la maquinaria necesarios para la adquisición e instalación de los equipos contratados, aumentados entre un 1 y un 3 %, debido a los medios auxiliares y costes indirectos que surgen. Los costes de transporte, envío y formación, en los casos en los casos en los que surjan, se encuentran incluidos en las unidades de obra.

Artículo 37. Precios contradictorios

El Proveedor, antes de iniciar sus labores con respecto al proyecto, tendrá acceso a la parte del Documento V. PRESUPUESTO que determine el precio de las unidades de obra que deba completar, de forma que, si detecta fallos o considera que el precio ahí descrito es contradictorio, deberá presentar una solicitud de revisión por escrito al Director de Obra en la que aporte el precio que considera correcto. El Director de Obra junto con el Promotor, serán los encargados de deliberar cual es el precio a fijar. En caso de aceptar la sugerencia del Proveedor, se redactará un Acta de modificación de precios de unidad de obra, el cual deberá estar firmado por el Promotor, el Director de Obra y el Proveedor o su representante.

En caso de no realizarse ninguna solicitud de revisión por parte del Proveedor antes del inicio de sus labores con respecto al proyecto (diseño, construcción, envío/transporte, instalación de equipos), este deberá ajustarse a los precios incluidos en el Documento V. PRESUPUESTOS, no teniendo derecho a reclamar modificaciones.

EPÍGRAFE 3. VALORACIÓN Y ABONO DE LOS TRABAJOS

Artículo 38. Certificaciones

Tras la finalización de los trabajos, el Director de Obra llevará a cabo la inspección pertinente que certificará que los trabajos se han llevado a cabo conforme a lo establecido en el TÍTULO I. PLIEGO DE CONDICIONES DE ÍNDOLE TÉCNICA. Al inicio de la recepción provisional se abonará la mitad del importe de la unidad de obra, siguiendo lo establecido en el Documento V. PRESUPUESTOS, de forma que la segunda mitad se abonará una vez finalizado este periodo y realizada la recepción final, tras verificar que el estado de los equipos es el mismo que al inicio de la recepción provisional.

Si al llevar a cabo las inspecciones pertinentes, el Director de Obra detectara que no se ha seguido lo establecido en el PLIEGO y/o defectos o fallos internos, no se realizará el abono antes de su subsanación. De la misma forma, si se detectaran vicios o defectos tras el periodo de recepción provisional, la segunda mitad del pago no se realizaría hasta que estos fueran solucionados por el Proveedor.

Artículo 39. Abonos por trabajos especiales no contratados

El Proveedor, al inicio de su relación encontrará a su disposición los documentos principales que componen el proyecto, lo que incluye el Documento II. PLANOS, el Documento IV. MEDICIONES, el Documento V. PRESUPUESTOS y los Anejos. Es su obligación la revisión y análisis de todos estos ellos, de forma que, al inicio del proyecto, debe presentar por escrito solicitudes de modificación de las unidades de obra y los presupuestos cuando, a su juicio, existan fallos o contradicciones en ellos. De esta forma, una vez revisados los documentos e iniciado el trabajo, el Proveedor no podrá reclamar abonos especiales por unidades de obra llevadas a cabo y no incluidas en los documentos del proyecto.

Artículo 40. Suspensión por retraso de pagos

El abono de las unidades de obra se llevará a cabo tal y como se explica en el Artículo 38 del TÍTULO III. PLIEGO DE CONDICIONES DE ÍNDOLE ECONÓMICA. En caso de requerir una forma de pago distinta, antes del inicio de los trabajos, deberá presentar una solicitud por escrito al Director de Obra, el cual la transmitirá al Promotor, que será el que decida si acepta la solicitud del Proveedor o no. De cualquier forma, el Proveedor no podrá suspender, ralentizar o disminuir la calidad del trabajo excusándose en retrasos en los pagos.

Artículo 41. Indemnización por suspensión o retraso en los trabajos

En el caso en el que, intencionalmente, el Proveedor no respete el programa de tiempos al que se debe ajustar y, de esta forma, altere el desarrollo del proyecto y la puesta en marcha de la línea productiva; este deberá indemnizar al Promotor con el valor del producto que se habría producido sin alteraciones en el cronograma. En casos extremos el Promotor tendrá el derecho a rescindir el contrato.

Artículo 42. Indemnización por daños de fuerza mayor al Proveedor

El Proveedor recibirá una indemnización en forma del abono de las unidades de obra realizadas, en el caso de sufrir daños por fuerza mayor, entendiendo estos como:

- Enfermedades, epidemias y pandemias que obliguen a la parálisis de cualquier actividad económica.
- Incendios por electricidad atmosférica
- Avenidas repentinas de ríos cuando ocurran en épocas en las que no suelen producirse
- Corrimientos del terreno sobre el que se sitúa la zona de trabajo
- Terremotos y desprendimientos de rocas
- Vientos huracanados, tornados y fenómenos de la misma naturaleza
- Protestas, saqueos, rebeliones y sediciones de la población que tengan lugar y/o causen daños en la zona de trabajo
- Guerras y conflictos armados en la zona de trabajo

El Proveedor tendrá derecho a esta indemnización siempre y cuando, en la medida de lo posible, tome las medidas necesarias para minimizar riesgos y daños, cumpliendo con lo establecido en el presente PLIEGO. En ningún caso se consideran daños por fuerza mayor aquellos producidos y relacionados con negligencias, utilización de equipos en mal estado y/o daños causados por trabajadores con formación insuficiente.

TÍTULO III. PLIEGO DE CONDICIONES DE ÍNDOLE LEGAL

EPÍGRAFE. 1. EPÍGRAFE ÚNICO

Artículo 43. Trabajos a los que se refiere el contrato

Al inicio de la relación laboral, el contrato que regula los trabajos y funciones a llevar a cabo por los agentes implicados, será firmado por todos ellos. Los detalles de los trabajos a realizar se recogen en el Documento II. PLANOS y en el Documento III. PLIEGO DE CONDICIONES, en sus distintos títulos, mientras que el importe de estos trabajos se recoge en el Documento V. PRESUPUESTOS. En caso de existir cualquier contradicción entre estos documentos sobre las características de los trabajos a realizar, se seguirá lo indicado en el Documento III. PLIEGO DE CONDICIONES. Si existiera cualquier duda o error en estos documentos, se deberá consultar al Director de Obra o al Proyectista.

Artículo 44. Documentos del proyecto

El Proveedor tendrá acceso a los documentos que componen el proyecto. Este presenta dos tipos de documentos:

DOCUMENTO N°3. PLIEGO DE CONDICIONES

-Los documentos contractuales, compuestos por el Documento II. PLANOS, el Documento III. PLIEGO DE CONDICIONES, el Documento IV. MEDICIONES el Documento V. PRESUPUESTOS y los Anejos VIII. SEGURIDAD Y SALUD y X. JUSTIFICACIÓN DE PRECIOS.

-Los documentos informativos, compuestos por el Documento I. MEMORIA y sus anejos aportan información adicional sobre las características y desarrollo del proyecto.

Artículo 45. Rescisión del contrato

Será posible la rescisión del contrato con el Proveedor en las siguientes situaciones:

-En el caso en el que el Proveedor no se ajuste a lo recogido en los documentos contractuales del proyecto.

-En el caso de incapacidad del Proveedor para llevar a cabo los trabajos que se comprometió a completar.

-En el caso de detección, por parte del Director de Obra, el Proyectista y/o Promotor de faltas administrativas, ocultados por el Proveedor, como falta de permisos o licencias.

-En el caso de no respetar, de forma intencionada e injustificada, el cronograma del proyecto y programa de ejecución de obras.

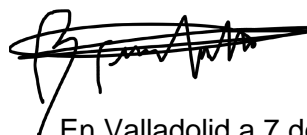
-En el caso de comisión de delitos por parte del Proveedor y/o sus trabajadores en el lugar de trabajo.

-En el caso quiebra o cese del negocio.

-En el caso de muerte del Proveedor sin herederos o en el caso en el que estos no acepten las condiciones del contrato y/o no continúen con la actividad.

Escriba el texto aquí

FDO. RODRIGO HERRERA SANZ



En Valladolid a 7 de junio de 2020



Universidad de Valladolid

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍAS AGRARIAS

Grado en Ingeniería Forestal y del Medio Natural

Proyecto de diseño de línea de producción de bacterias y hongos para la mejora de suelos forestales.

DOCUMENTO Nº4. MEDICIONES

Alumno: Rodrigo Herrera Sanz

Tutor: María Elena Hidalgo Rodríguez

Cotutor: Joaquín Navarro Hevia

Director: Jaime Olaizola Suárez

Índice de las Mediciones

CAPÍTULO.I. TRABAJOS PREVIOS	1
EPÍGRAFE 1.1: IDENTIFICACIÓN GENÉTICA	1
EPÍGRAFE 1.2: PRUEBA PRODUCCIÓN EN ESTADO SÓLIDO <i>TRICHODERMA SPP.</i>	2
CAPÍTULO. II. LÍNEA DE PRODUCCIÓN	3
EPÍGRAFE 2.1: FASE I	3
EPÍGRAFE 2.2: FASE II	4
EPÍGRAFE 2.3: FASE III	4
EPÍGRAFE 2.4: OTROS	5
CAPÍTULO. III. SEGURIDAD Y SALUD	7
EPÍGRAFE 3.1: SEGURIDAD	7
EPÍGRAFE 3.2: SALUD	7

CAPÍTULO. I. TRABAJOS PREVIOS**EPÍGRAFE 1.1 IDENTIFICACIÓN GENÉTICA**

Código	Ud.	Descripción	Subtotal (unidad)	Medición (unidad)								
1.1.1	Preparaciones	Proceso de extracción del material genético (ADN) de las muestras número uno y dos, siguiendo el protocolo indicado por kits específicos.										
		<table border="1"> <thead> <tr> <th>Uds.</th> <th>Ancho</th> <th>Largo</th> <th>Alto</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Uds.	Ancho	Largo	Alto	1				Ud.: 1	Total, Ud.:1
Uds.	Ancho	Largo	Alto									
1												
1.1.2	Preparaciones	Proceso de amplificación del ADN de las muestras uno y dos mediante la realización de PCR.										
		<table border="1"> <thead> <tr> <th>Uds.</th> <th>Ancho</th> <th>Largo</th> <th>Alto</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Uds.	Ancho	Largo	Alto	1				Ud.: 1	Total, Ud.: 1
Uds.	Ancho	Largo	Alto									
1												
1.1.3	Preparaciones	Proceso de amplificación del ADN de las muestras tres y cuatro mediante la realización de PCR.										
		<table border="1"> <thead> <tr> <th>Uds.</th> <th>Ancho</th> <th>Largo</th> <th>Alto</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Uds.	Ancho	Largo	Alto	1				Ud.: 1	Total, Ud.: 1
Uds.	Ancho	Largo	Alto									
1												
1.1.4	Preparaciones	Consecución de la técnica molecular de electroforesis para la confirmación y evaluación de la amplificación del ADN de las cuatro muestras.										
		<table border="1"> <thead> <tr> <th>Uds.</th> <th>Ancho</th> <th>Largo</th> <th>Alto</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Uds.	Ancho	Largo	Alto	1				Ud.: 1	Total, Ud.: 1
Uds.	Ancho	Largo	Alto									
1												
1.1.5	Muestras	Secuenciación genética para la identificación del género y especie de muestras de ADN, llevado a cabo por parte de la empresa STAB Vida.										

Uds.	Ancho	Largo	Alto	Subtotal (unidad)	Medición (unidad)
4				Ud.: 4	Total, Ud.: 4

EPÍGRAFE 1.2 PRUEBA PRODUCCIÓN EN SÓLIDO *TRICHODERMA SPP.*

Código	Ud.	Descripción	Subtotal (unidad)	Medición (unidad)
1.2.1	Cultivo	Preparación del inóculo en placa Petri, mediante cultivo en medio sólido (PDA) de una muestra de <i>Trichoderma spp.</i>		
		Uds. Ancho Largo Alto 2	Ud.: 2	Total, Ud.: 2
1.2.2	Cultivo	Preparación del inóculo en medio líquido (PDB) de una muestra de <i>Trichoderma spp.</i> para la posterior inoculación de los medios de cultivo sólidos.		
		Uds. Ancho Largo Alto 2	Ud.: 2	Total, Ud.: 2
1.2.3	Preparación	Preparación del trigo integral para su uso como medio de cultivo en la prueba de producción en estado sólido.		
		Uds. Ancho Largo Alto 1	Ud.: 1	Total, Ud.: 1
1.2.4	Preparación	Preparación del centeno integral para su uso como medio de cultivo en la prueba de producción en estado sólido.		
		Uds. Ancho Largo Alto 1	Ud.: 1	Total, Ud.: 1
1.2.5	Preparación	Preparación de la cebada integral para su uso como medio de cultivo en la prueba de producción en estado sólido.		

		Uds. 1	Ancho	Largo	Alto	Ud: 1	Total, Ud.: 1
1.2.6	Preparación	Preparación del arroz integral para su uso como medio de cultivo en la prueba de producción en estado sólido.				Ud.: 1	Total, Ud.: 1
1.2.7	Medición	Medición del número de unidades formadoras de colonia (UFC) de cada medio utilizado.				Ud.: 4	Total, Ud.: 4

CAPÍTULO. II.LÍNEA DE PRODUCCIÓN

EPÍGRAFE 2.1 FASE I

Código	Ud.	Descripción	Subtotal (unidad)	Medición (unidad)
2.1.1	Unidades	Sistema autoclave/esterilizador modelo Celitron Azteca A-456 de alta capacidad. Incluye la entrega, instalación y formación de personal.	Ud.: 1	Total, Ud.: 1
2.1.2	Unidades	Sistema de biofermentación Bionet F1 MB de 3 litros. Incluye el embalaje, transporte, instalación y formación de personal.	Ud.: 1	Total, Ud.: 1
2.1.3	Unidades	Fregadero industrial de acero inoxidable AISI 304 18/10, de		

700 mm de fondo, equipado con una cuba de dimensiones 860 x 500 x 380 mm y una capacidad de 163,4 litros. Incluye el envío a las instalaciones del cliente.

Uds.	Ancho	Largo	Alto
2			

Ud.: 2	Total, Ud.: 2
--------	---------------

EPÍGRAFE 2.2 FASE II

Código	Ud.	Descripción	Subtotal (unidad)	Medición (unidad)
--------	-----	-------------	-------------------	-------------------

2.2.1	Unidades	Sistema de biofermentación Bionet F2 MB de 30 litros. Incluye el embalaje, transporte, instalación y formación del personal.		
-------	----------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--	--

Uds.	Ancho	Largo	Alto
1			

Ud.: 1	Total, Ud.: 1
--------	---------------

2.2.2	Unidades	Sistema de biofermentación Bionet F3 MB de 100 litros. Incluye el embalaje, transporte, instalación y formación del personal.		
-------	----------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--	--

Uds.	Ancho	Largo	Alto
1			

Ud.: 1	Total, Ud.: 1
--------	---------------

EPÍGRAFE 2.3 FASE III

Código	Ud.	Descripción	Subtotal (unidad)	Medición (unidad)
--------	-----	-------------	-------------------	-------------------

2.3.1	Unidades	Sistema de liofilización Kemolo FD-50. Incluye el transporte, instalación, puesta en marcha y prueba del equipo en las instalaciones del cliente.		
-------	----------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--	--

Uds.	Ancho	Largo	Alto
1			

Ud.: 1	Total, Ud.: 1
--------	---------------

2.3.2	Unidades	Bandeja de liofilización Teclen® Lyoprotect® LPMU-V2740B-WS para liofilización a granel.								
		<table border="1"> <tr> <td>Uds.</td> <td>Ancho</td> <td>Largo</td> <td>Alto</td> </tr> <tr> <td>36</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </table>	Uds.	Ancho	Largo	Alto	36			
Uds.	Ancho	Largo	Alto							
36										
		<table border="1"> <tr> <td>Ud.: 36</td> <td>Total, Ud.: 36</td> </tr> </table>	Ud.: 36	Total, Ud.: 36						
Ud.: 36	Total, Ud.: 36									

2.3.3	Unidades	Sistema de refrigeración con cámara frigorífica (0°-6°C) Impafri de dimensiones 1,76 (L) x 1,36 (F) x 2,28 (A) metros, con un espesor de panel de 80 mm, sin suelo y equipada con una estantería de cuatro niveles y dimensiones 1,60 (L) x 0,37 (F) x 1,67 (A) metros. Incluye el transporte.								
		<table border="1"> <tr> <td>Uds.</td> <td>Ancho</td> <td>Largo</td> <td>Alto</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </table>	Uds.	Ancho	Largo	Alto	1			
Uds.	Ancho	Largo	Alto							
1										
		<table border="1"> <tr> <td>Ud.: 1</td> <td>Total, Ud.: 1</td> </tr> </table>	Ud.: 1	Total, Ud.: 1						
Ud.: 1	Total, Ud.: 1									

EPÍGRAFE 2.4 OTROS

Código	Ud.	Descripción	Subtotal (unidad)	Medición (unidad)								
2.4.1	Unidades	Garrafas de polipropileno de 10 litros esterilizables en autoclave Thermo Scientific™ Nalgene™, de 39 cm de altura y 22,5 cm de diámetro exterior. Incluye el envío.										
		<table border="1"> <tr> <td>Uds.</td> <td>Ancho</td> <td>Largo</td> <td>Alto</td> </tr> <tr> <td>15</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </table>	Uds.	Ancho	Largo	Alto	15					
Uds.	Ancho	Largo	Alto									
15												
			Ud.: 15	Total, Ud.: 15								
2.4.2	Unidades	Carro de servicio en acero inoxidable AISI 304, de dos niveles y capacidad de carga de 100 kg y medidas 890 (L) x 590 (F) x 950 (A) mm.										
		<table border="1"> <tr> <td>Uds.</td> <td>Ancho</td> <td>Largo</td> <td>Alto</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </table>	Uds.	Ancho	Largo	Alto	2					
Uds.	Ancho	Largo	Alto									
2												
			Ud.: 2	Total, Ud.: 2								

2.4.3	Unidades	Contenedor de basuras de 770 litros de capacidad, con tapa plana. Equipado con ruedas y frenos. Envío gratuito.								
		<table border="1"> <thead> <tr> <th>Uds.</th> <th>Ancho</th> <th>Largo</th> <th>Alto</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>5</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Uds.	Ancho	Largo	Alto	5			
Uds.	Ancho	Largo	Alto							
5										
		<table border="1"> <tr> <td>Ud.: 5</td> <td>Total, Ud.: 5</td> </tr> </table>	Ud.: 5	Total, Ud.: 5						
Ud.: 5	Total, Ud.: 5									
2.4.4	Unidades	Taquilla metálica individual, para uso individual con llave, colocada								
		<table border="1"> <thead> <tr> <th>Uds.</th> <th>Ancho</th> <th>Largo</th> <th>Alto</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>4</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Uds.	Ancho	Largo	Alto	4			
Uds.	Ancho	Largo	Alto							
4										
		<table border="1"> <tr> <td>Ud.: 4</td> <td>Total, Ud.: 4</td> </tr> </table>	Ud.: 4	Total, Ud.: 4						
Ud.: 4	Total, Ud.: 4									
2.4.5	Unidades	Banco de madera capacidad para 5 personas								
		<table border="1"> <thead> <tr> <th>Uds.</th> <th>Ancho</th> <th>Largo</th> <th>Alto</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Uds.	Ancho	Largo	Alto	1			
Uds.	Ancho	Largo	Alto							
1										
		<table border="1"> <tr> <td>Ud.: 1</td> <td>Total, Ud.: 1</td> </tr> </table>	Ud.: 1	Total, Ud.: 1						
Ud.: 1	Total, Ud.: 1									
2.4.6	Unidades	Caseta multiusos, paneles de relleno con esquinas redondeadas. 3,28 m (L) x 3 m (An)								
		<table border="1"> <thead> <tr> <th>Uds.</th> <th>Ancho</th> <th>Largo</th> <th>Alto</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Uds.	Ancho	Largo	Alto	1			
Uds.	Ancho	Largo	Alto							
1										
		<table border="1"> <tr> <td>Ud.: 1</td> <td>Total, Ud.: 1</td> </tr> </table>	Ud.: 1	Total, Ud.: 1						
Ud.: 1	Total, Ud.: 1									
3.4.7	Unidades	Mesa de madera con capacidad para 10 personas								
		<table border="1"> <thead> <tr> <th>Uds.</th> <th>Ancho</th> <th>Largo</th> <th>Alto</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Uds.	Ancho	Largo	Alto	1			
Uds.	Ancho	Largo	Alto							
1										
		<table border="1"> <tr> <td>Ud.: 1</td> <td>Total, Ud.: 1</td> </tr> </table>	Ud.: 1	Total, Ud.: 1						
Ud.: 1	Total, Ud.: 1									


CAPÍTULO. III. SEGURIDAD Y SALUD**EPÍGRAFE 3.1 SEGURIDAD**

Código	Ud.	Descripción	Subtotal (unidad)	Medición (unidad)
3.1.1	Unidades	Extintor portátil de nieve carbónica CO ₂ , de eficacia 34B, con 2 kg de agente extintor, vaso difusor, según la norma UNE 23110.		
		Uds. Ancho Largo Alto 3	Ud.: 3	Total, Ud.: 3
3.1.2	Unidades	Bloque alumbrado de emergencia incandescente decorativo IP65, funcionamiento emergencia-señalización con lámpara de 8 w, autonomía superior a 3 horas, instalado		
		Uds. Ancho Largo Alto 1	Ud.: 1	Total, Ud.: 1
3.1.3	Unidades	Cartel indicativo de riesgo sin soporte. Colocado.		
		Uds. Ancho Largo Alto 8	Ud.: 8	Total, Ud.: 8

EPÍGRAFE 3.2 SALUD

Código	Ud.	Descripción	Subtotal (unidad)	Medición (unidad)
3.2.1	Unidades	Botiquín de primeros auxilios. Contiene lo establecido en el Real Decreto 486/1997		
		Uds. Ancho Largo Alto 1	Ud.: 1	Total, Ud.: 1

FDO. RODRIGO HERRERA SANZ



En Valladolid a 7 de junio de 2020



Universidad de Valladolid

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍAS AGRARIAS

Grado en Ingeniería Forestal y del Medio Natural

Proyecto de diseño de línea de producción de bacterias y hongos para la mejora de suelos forestales.

DOCUMENTO N°5. PRESUPUESTO

Alumno: Rodrigo Herrera Sanz

Tutor: María Elena Hidalgo Rodríguez

Cotutor: Joaquín Navarro Hevia

Director: Jaime Olaizola Suárez

Índice del Presupuesto

CUADRO DE PRECIOS Nº1	1
CAPÍTULO.I. TRABAJOS PREVIOS	1
EPÍGRAFE 1.1: IDENTIFICACIÓN GENÉTICA	1
EPÍGRAFE 1.2: PRUEBA PRODUCCIÓN EN ESTADO SÓLIDO <i>TRICHODERMA SPP.</i>	2
CAPÍTULO. II. LÍNEA DE PRODUCCIÓN	3
EPÍGRAFE 2.1: FASE I	3
EPÍGRAFE 2.2: FASE II	3
EPÍGRAFE 2.3: FASE III	4
EPÍGRAFE 2.4: OTROS	4
CAPÍTULO. III. SEGURIDAD Y SALUD	6
EPÍGRAFE 3.1 SALUD	6
EPÍGRAFE 3.2 SEGURIDAD	6
CUADRO DE PRECIOS Nº2	7
CAPÍTULO.I. TRABAJOS PREVIOS	7
EPÍGRAFE 1.1: IDENTIFICACIÓN GENÉTICA	7
EPÍGRAFE 1.2: PRUEBA PRODUCCIÓN EN ESTADO SÓLIDO <i>TRICHODERMA SPP.</i>	10
CAPÍTULO. II. LÍNEA DE PRODUCCIÓN	15
EPÍGRAFE 2.1: FASE I	15
EPÍGRAFE 2.2: FASE II	16
EPÍGRAFE 2.3: FASE III	17
EPÍGRAFE 2.4: OTROS	18
CAPÍTULO. III. SEGURIDAD Y SALUD	20
EPÍGRAFE 3.1: SEGURIDAD	20
EPÍGRAFE 3.2: SALUD	21

PRESUPUESTOS PARCIALES	22
CAPÍTULO.I. TRABAJOS PREVIOS	22
EPÍGRAFE 1.1: IDENTIFICACIÓN GENÉTICA	22
EPÍGRAFE 1.2: PRUEBA PRODUCCIÓN EN ESTADO SÓLIDO <i>TRICHODERMA SPP.</i>	23
CAPÍTULO. II. LÍNEA DE PRODUCCIÓN	24
EPÍGRAFE 2.1: FASE I	24
EPÍGRAFE 2.2: FASE II	24
EPÍGRAFE 2.3: FASE III	25
EPÍGRAFE 2.4: OTROS	25
CAPÍTULO. III. SEGURIDAD Y SALUD	27
EPÍGRAFE 3.1: SEGURIDAD	27
EPÍGRAFE 3.2: SALUD	27
RESUMEN DE LOS PRESUPUESTOS PARCIALES	28
PRESUPUESTO GENERAL	29
PRESUPUESTO DE EJECUCIÓN POR CONTRATA	30

CUADRO DE PRECIOS Nº1**CAPÍTULO.I. TRABAJOS PREVIOS****EPÍGRAFE 1.1 IDENTIFICACIÓN GENÉTICA**

Nº orden	Ud.	Descripción	Precio (€)	Precio en letra
1.1.1	Preparaciones	Proceso de extracción del material genético (ADN) de las muestras número uno y dos, siguiendo el protocolo indicado por kits específicos.	34,01	TREINTA Y CUATRO EUROS Y UN CÉNTIMO
1.1.2	Preparaciones	Proceso de amplificación del ADN de las muestras uno y dos, mediante la realización de la PCR.	73,94	SETENTA Y TRES EUROS Y NOVENTA Y CUATRO CÉNTIMOS
1.1.3	Preparaciones	Proceso de amplificación del ADN de las muestras tres y cuatro, mediante la realización de la PCR.	76,28	SETENTA Y SEIS EUROS Y VEINTIOCHO CÉNTIMOS
1.1.4	Preparaciones	Consecución de la técnica molecular de electroforesis para la confirmación y evaluación de la amplificación del ADN de las cuatro muestras.	45,71	CUARENTA Y CINCO EUROS Y SETENTA Y UN CÉNTIMOS
1.1.5	Muestra	Secuenciación genética para la identificación del género y especie de una de las muestras de ADN, llevado a cabo por parte de la empresa STAB Vida.	5,31	CINCO EUROS Y TREINTA Y UN CÉNTIMOS

EPÍGRAFE 1.2 PRUEBA PRODUCCIÓN EN SÓLIDO *TRICHODERMA SPP.*

Nº orden	Ud.	Descripción	Precio (€)	Precio en letra
1.2.1	Cultivos	Preparación del inóculo en placa Petri, mediante cultivo en medio sólido (PDA) de una muestra de <i>Trichoderma spp.</i>	4,96	CUATRO EUROS Y NOVENTA Y SEIS CÉNTIMOS
1.2.2	Cultivos	Preparación del inóculo en medio líquido (PDB) de una muestra de <i>Trichoderma spp.</i>	18,64	DIECIOCHO EUROS Y SESENTA Y CUATRO CÉNTIMOS
1.2.3	Preparación	Preparación del trigo integral para su uso como medio de cultivo en la prueba de producción en estado sólido.	14,68	CATORCE EUROS Y SESENTA Y OCHO CÉNTIMOS
1.2.4	Preparación	Preparación del centeno integral para su uso como medio de cultivo en la prueba de producción en estado sólido.	14,56	CATORCE EUROS Y CINCUENTA Y SEIS CÉNTIMOS
1.2.5	Preparación	Preparación de la cebada integral para su uso como medio de cultivo en la prueba de producción en estado sólido.	14,59	CATORCE EUROS Y CINCUENTA Y NUEVE CÉNTIMOS
1.2.6	Preparación	Preparación del arroz integral para su uso como medio de cultivo en la prueba de producción en estado sólido.	25,68	VEINTICINCO EUROS Y SESENTA Y OCHO CÉNTIMOS
1.2.7	Mediciones	Medición del número de unidades formadoras de colonia (UFC) de cada medio utilizado.	12,88	DOCE EUROS Y OCHENTA Y OCHO CÉNTIMOS

CAPÍTULO. II. LÍNEA DE PRODUCCIÓN**EPÍGRAFE 2.1: FASE I**

Nº orden	Ud.	Descripción	Precio (€)	Precio en letra
2.1.1	Unidades	Sistema autoclave/esterilizador modelo Celitron Azteca A-456 de alta capacidad.	52185,53	CINCUENTA Y DOS MIL CIENTO OCHENTA Y CINCO EUROS Y CINCUENTA Y TRES CÉNTIMOS
2.1.2	Unidades	Sistema de biofermentación Bionet F1 MB de 3 litros. Incluye el embalaje, transporte, instalación y formación de personal.	31816,70	TREINTA Y UN MIL OCHOCIENTOS DIECISES EUROS Y SETENTA CÉNTIMOS
2.1.3	Unidades	Fregadero industrial de acero inoxidable AISI 304 18/10, de 700 mm de fondo, equipado con una cuba de dimensiones 860 x 500 x 380 mm y una capacidad de 163,4 litros. Incluye el envío a las instalaciones del cliente.	1146,62	MIL CIENTO CUARENTA Y SEIS EUROS Y SESENTA Y DOS CÉNTIMOS

EPÍGRAFE 2.2: FASE II

Nº orden	Ud.	Descripción	Precio (€)	Precio en letra
2.2.1	Unidades	Sistema de biofermentación Bionet F2 MB de 30 litros. Incluye el embalaje, transporte, instalación y formación del personal.	95470,70	NOVENTA Y CINCO MIL CUATROCIENTOS SETENTE EUROS Y SETENTA CÉNTIMOS
2.2.2	Unidades	Sistema de biofermentación Bionet F3 MB de 100 litros. Incluye el embalaje, transporte, instalación y formación del personal.	150610,00	CIENTO CINCUENTA MIL SEISCIENTOS DIEZ EUROS

--	--	--	--	--

EPÍGRAFE 2.3: FASE III

Nº orden	Ud.	Descripción	Precio (€)	Precio en letra
2.3.1	Unidades	Sistema de liofilización Kemolo FD-50. Incluye el transporte, instalación, puesta en marcha y prueba del equipo en las instalaciones del cliente.	51491,70	CINCUENTA Y UN MIL CUATROCIENTOS NOVENTA Y UN EUROS Y SETENTA CÉNTIMOS
2.3.2	Unidades	Sistema de refrigeración con cámara frigorífica (0°-6°C) Impafri de dimensiones 1,76 (L) x 1,36 (F) x 2,28 (A) metros, con un espesor de panel de 80 mm, sin suelo y equipada con una estantería de cuatro niveles y dimensiones 1,60 (L) x 0,37 (F) x 1,67 (A) metros. Incluye el transporte.	4658,84	CUATRO MIL SEISCIENTOS CINCUENTA Y OCHO EUROS Y OCHENTA Y CUATRO CÉNTIMOS

EPÍGRAFE 2.4: OTROS

Nº orden	Ud.	Descripción	Precio (€)	Precio en letra
2.4.1	Unidades	Garrafas de polipropileno de 10 litros esterilizables en autoclave Thermo Scientific™ Nalgene™, de 39 cm de altura y 22,5 cm de diámetro exterior. Incluye el envío.	1051,06	MIL CINCUENTA Y UN EUROS Y SEIS CÉNTIMOS
2.4.2	Unidades	Carro de servicio en acero inoxidable AISI 304, de dos niveles y capacidad de carga de 100 kg y medidas 890 (L) x 590 (F) x 950 (A) mm.	425,72	CUATROCIENTOS VEINTICINCO EUROS Y SETENTA Y DOS CÉNTIMOS

DOCUMENTO Nº5. PRESUPUESTOS

2.4.3	Unidades	Contenedor de basuras de 770 litros de capacidad, con tapa plana. Equipado con ruedas y frenos. Envío gratuito.	226,60	DOSCIENTOS VEINTISEIS EUROS Y SESENTA CÉNTIMOS
2.4.4	Unidades	Taquilla metálica individual, para uso individual con llave, colocada	79,44	SETENTA Y NUEVE EUROS Y CUARENTA CUATRO CÉNTIMOS
2.4.5	Unidades	Banco de madera capacidad para 5 personas	46,92	CUARENTA Y SEIS EUROS Y NOVENTA Y DOS CÉNTIMOS
2.4.6	Unidades	Caseta multiusos, paneles de relleno con esquinas redondeadas. 3,28 m (L) x 3 m (An)	5459,00	CINCO MIL CUATROCIENTOS CINCUENTA Y NUEVA EUROS Y CERO CÉNTIMOS
2.4.7	Unidades	Mesa de madera con capacidad para 10 personas	111,89	CIENTO ONCE EUROS Y OCHENTA Y NUEVE CÉNTIMOS

CAPÍTULO. III. SEGURIDAD Y SALUD**EPÍGRAFE 3.1 SEGURIDAD**

Nº orden	Ud.	Descripción	Precio (€)	Precio en letra
3.1.1	Unidades	Extintor portátil de nieve carbónica CO ₂ , de eficacia 34B, con 2 kg de agente extintor, vaso difusor, según la norma UNE 23110.	99,63	NOVENTA Y NUEVE EUROS Y SESENTA Y TRES CÉNTIMOS
3.1.2	Unidades	Bloque alumbrado de emergencia incandescente decorativo IP65, funcionamiento emergencia-señalización con lámpara de 8 w, autonomía superior a 3 horas, instalado	161,97	CIENTO SESENTA Y UN EUROS Y NOVENTA Y SIETE CÉNTIMOS
3.1.3	Unidades	Cartel indicativo de riesgo sin soporte. Colocado.	3,57	TRES EUROS Y CINCUENTA Y SIETE CÉNTIMOS

EPÍGRAFE 3.2 SALUD

Nº orden	Ud.	Descripción	Precio (€)	Precio en letra
3.2.1	Unidades	Botiquín de primeros auxilios. Contiene lo establecido en el Real Decreto 486/1997	53,36	CINCUENTA Y TRES EUROS Y TREINTA Y SEIS CÉNTIMOS

CUADRO DE PRECIOS Nº2**CAPÍTULO I. TRABAJOS PREVIOS****EPÍGRAFE 1.1 IDENTIFICACIÓN GENÉTICA**

Orden	Ud	Descripción	Rendimiento	Precio (€)	Subtotal	Importe (€)
1.1.1	Prep	Proceso de extracción del material genético (ADN) de las muestras número uno y dos, siguiendo el protocolo indicado por kits específicos.				
		(Materiales)				
		Kit de extracción E.Z.N.A.®Plant DNA Kit con 200 preparaciones equipado con HiBind®DNA Mini Column y mezclas tampón. Extracción rápida, fiable y de alta calidad del ADN celular.	2,00 ud.	2,30	4,60	
		Tubos Eppendorf 5ml estériles.	4,00 ud	0,20	0,80	
		(Mano de obra)				
		Técnico laboratorio	1,50 h	17,72	26,58	
		(Maquinaria)				
		Centrifugadora angular	1,50 h	0,05	0,08	
%CD		Medios auxiliares		3% Costes directos	0,96	
				Total	33,02	
				3% Costes indirectos	0,99	
						34,01

1.1.2 Prep

Proceso de amplificación del ADN de las muestras uno y dos, mediante la realización de la PCR.			
(Materiales)			
	Kit de amplificación ilustra PuReTaq Ready-To-Go PCR Beads de 96 preparaciones.	2,00 prep.	1,80 3,60
	Primer ITS 4	5 µl	0,21 1,05
	Primer ITS 1	5 µl	0,21 1,05
(Mano de obra)			
	Técnico laboratorio	3,50 h	17,72 62,02
(Maquinaria)			
	PCR Thermo cycler	3,50 h	0,56 1,96
%CD	Medios auxiliares	3% Costes directos	2,09
		Total	71,77
		3% Costes indirectos	2,15
			73,94

1.1.3 Prep Proceso de amplificación del ADN de las muestras tres y cuatro, mediante la aplicación de la PCR.

(Materiales)

Kit de amplificación ilustra PuReTaq Ready-To-Go PCR Beads de 96 preparaciones.

Primer 16SF 6 µl 0,36 2,16

Primer 16SR 6 µl 0,36 2,16

(Mano de obra)

Técnico laboratorio 3,50 h 17,72 62,02

(Maquinaria)

DOCUMENTO Nº5. PRESUPUESTOS

	PCR Thermo cycler	3,50 h	0,56	1,96
%CD	Medios auxiliares	3% Costes directos		2,16
		Total		74,06
		3% Costes indirectos		2,22
				76,28

1.1.4 Pre Consecución de la técnica molecular de electroforesis para la confirmación y evaluación de la amplificación del ADN de las cuatro muestras.

(Materiales)

Agarosa	1,50 g	2,66	3,99
Midori green	15,00 µl	0,09	1,35
TAE buffer 10X	25,00 ml	0,04	1,10
Loading buffer	8,00 µl	0,00	0,05
Ladder 100bp DNA	5,00 µl	0,99	4,96

(Mano de obra)

Técnico laboratorio	1,50 h	17,72	26,58
Director de laboratorio	0,25 h	20,06	5,02

(Maquinaria)

Cubeta de electroforesis	0,50 h	0,07	0,04
--------------------------	--------	------	------

%CD	Medios auxiliares	3% Costes directos		1,29
		Total		44,38
		3% Costes indirectos		1,33

45,71

1.1.5 Mue. Secuenciación genética para la identificación del género y especie de una de las muestras de ADN, llevado a cabo por parte de la empresa STAB Vida.

Secuenciación	1 muestra	5,00	5,00
---------------	-----------	------	------

DOCUMENTO Nº5. PRESUPUESTOS

%CD	Medios auxiliares	3% Costes directos	0,15
		Total	5,15
		3% Costes indirectos	0,16
			5,31

EPÍGRAFE 1.2 PRUEBA PRODUCCIÓN EN SÓLIDO *TRICHODERMA SPP.*

Orden	Ud	Descripción	Rendimiento	Precio (€)	Subtotal	Importe (€)
1.2.1	Cul	Preparación del inóculo en placa Petri, mediante cultivo en medio sólido (PDA) de una muestra de <i>Trichoderma spp.</i>				
		(Materiales)				
		Patata Dextrosa Agar (PDA). 250g	0,60 g	0,34	0,20	
		(Mano de obra)				
		Técnico laboratorio	0,25 h	17,72	4,43	
		(Maquinaria)				
		Campana de gases laboratorio	0,25 h	0,19	0,05	
%CD		Medios auxiliares		3% Costes directos	0,14	
				Total	4,82	
				3% Costes indirectos	0,14	
						4,96

1.2.2	Cul	Preparación del inóculo en medio líquido (PDB) de una muestra de <i>Trichoderma spp.</i>				
		(Materiales)				
		Patata Dextrosa Caldo (PDB). 250g	24,00 g	0,56	13,44	
		(Mano de obra)				
		Técnico laboratorio	0,25 h	17,72	4,43	
		(Maquinaria)				

DOCUMENTO Nº5. PRESUPUESTOS

	Campana de gases laboratorio	0,25 h	0,19	0,05
%CD	Medios auxiliares	1% Costes directos		0,18
			Total	18,10
		3% Costes indirectos		0,54
				18,64

1.2.3 . Prep Preparación del trigo integral para su uso como medio de cultivo en la prueba de producción en estado sólido.

(Materiales)

Trigo integral	2,50 kg	0,23	0,58
Bolsa de muestreo estéril gran formato	1,00 ud	1,24	1,24

(Mano de obra)

Técnico laboratorio	0,50 h	17,72	8,86
Director de laboratorio	0,15 h	20,06	3,01

(Maquinaria)

Campana de gases laboratorio	0,50 h	0,19	0,10
Selladora levantamiento automático	0,50 h	0,08	0,04

%CD Medios auxiliares 3% Costes directos 0,42

Total 14,25

3% Costes indirectos 0,43

14,68

1.2.4 . Prep Preparación del centeno integral para su uso como medio de cultivo en la prueba de producción en estado sólido.

(Materiales)

Centeno integral	2,50 kg	0,19	0,48
------------------	---------	------	------

DOCUMENTO Nº5. PRESUPUESTOS

	Bolsa de muestreo estéril gran formato	1,00 ud	1,24	1,24
	<u>(Mano de obra)</u>			
	Técnico laboratorio	0,50 h	17,72	8,86
	Director de laboratorio	0,15 h	20,06	3,01
	<u>(Maquinaria)</u>			
	Campana de gases laboratorio	0,50 h	0,19	0,10
	Selladora levantamiento automático	0,50 h	0,08	0,04
%CD	<u>Medios auxiliares</u>	3% Costes directos		0,41
		Total		14,14
		3% Costes indirectos		0,42
				14,56

1.2.5 Prep . Preparación de la cebada integral para su uso como medio de cultivo en la prueba de producción en estado sólido.

(Materiales)

Cebada integral	2,50 kg	0,21	0,51
-----------------	---------	------	------

Bolsa de muestreo estéril gran formato	1,00 ud	1,24	1,24
-------------------------------------------	---------	------	------

(Mano de obra)

Técnico laboratorio	0,50 h	17,72	8,86
---------------------	--------	-------	------

Director de laboratorio	0,15 h	20,06	3,01
----------------------------	--------	-------	------

(Maquinaria)

Campana de gases laboratorio	0,50 h	0,19	0,10
---------------------------------	--------	------	------

Selladora levantamiento automático	0,50 h	0,08	0,04
------------------------------------------	--------	------	------

%CD	<u>Medios auxiliares</u>	3% Costes directos	0,41	
		Total	14,17	
		3% Costes indirectos	0,42	
				14,59

1.2.6 Prep . Preparación del arroz integral para su uso como medio de cultivo en la prueba de producción en estado sólido.

(Materiales)

Arroz integral	2,50 kg	4,38	10,95
----------------	---------	------	-------

Bolsa de muestreo estéril gran formato	1,00 ud	1,24	1,24
----------------------------------------	---------	------	------

(Mano de obra)

Técnico laboratorio	0,50 h	17,72	8,86
---------------------	--------	-------	------

Director de laboratorio	0,15 h	20,06	3,01
-------------------------	--------	-------	------

(Maquinaria)

Campana de gases laboratorio	0,50 h	0,19	0,10
------------------------------	--------	------	------

Selladora levantamiento automático	0,50 h	0,08	0,04
------------------------------------	--------	------	------

%CD	<u>Medios auxiliares</u>	3% Costes directos	0,73	
-----	--------------------------	--------------------	------	--

Total 24,93

3% Costes indirectos 0,75

25,68

1.2.7 Med. Medición del número de unidades formadoras de colonia (UFC) de cada medio utilizado.

(Mano de obra)

Técnico laboratorio	0,50 h	17,72	8,86
---------------------	--------	-------	------

DOCUMENTO Nº5. PRESUPUESTOS

	Director de laboratorio	0,15 h	20,06	3,01
	<u>(Maquinaria)</u>			
	Microscopio óptico	0,33 h	0,45	0,15
	Campana de gases laboratorio	0,50 h	0,19	0,10
	Selladora levantamiento automático	0,15 h	0,08	0,01
	Balanza laboratorio	0,50 h	0,02	0,01
%CD	Medios auxiliares	3% Costes directos		0,36
		Total		12,50
		3% Costes indirectos		0,38
				12,88

CAPÍTULO. II. LÍNEA DE PRODUCCIÓN**EPÍGRAFE 2.1: FASE I**

Orden	Uds.	Descripción	Rendimiento	Precio (€)	Subtotal	Importe (€)
2.1.1	Ud.	Sistema autoclave/esterilizador modelo Celitron Azteca A-456 de alta capacidad. Incluye la entrega, instalación y formación de personal.				
		(Materiales)				
		Autoclave/esterilizador Celitron Azteca A-456 de alta capacidad	1 ud.	50665,56	50665,56	
					Total	50665,56
				3 % Costes indirectos		1519,97
						52185,53
2.1.2	Ud.	Sistema de biofermentación Bionet F1 MB de 3 litros. Incluye el embalaje, transporte, instalación y formación de personal.				
		(Materiales)				
		Biorreactor Bionet F1 MB-3	1 ud	30890,00	30890,00	
					Total	30890,00
				3 % Costes indirectos		926,70
						31816,70
2.1.3	Ud.	Fregadero industrial de acero inoxidable AISI 304 18/10, de 700 mm de fondo, equipado con una cuba de dimensiones 860 x 500 x 380 mm y una capacidad de 163,4 litros. Incluye el envío a las instalaciones del cliente.				
		(Materiales)				
		Fregadero industrial de gran capacidad en acero inoxidable	1 ud	553,88	553,88	

(Mano de obra)

Peón	0,15 h	21,82	3,27
		Total	557,15
3 % Costes indirectos			16,71

573,86

EPÍGRAFE 2.2 FASE II

Orden	Uds.	Descripción	Rendimiento	Precio (€)	Subtotal	Importe (€)
-------	------	-------------	-------------	------------	----------	-------------

2.2.1	Ud	Sistema de biofermentación Bionet F2 MB de 30 litros. Incluye el embalaje, transporte, instalación y formación del personal.				
-------	----	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--	--	--	--

(Materiales)

Biorreactor Bionet F2 MB-30	1 ud	92690,00	92690,00
-----------------------------	------	----------	----------

Total 92690,00

3 % Costes indirectos 2780,70

95470,70

2.2.2	Ud	Sistema de biofermentación Bionet F3 MB de 100 litros. Incluye el embalaje, transporte, instalación y formación del personal.				
-------	----	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--	--	--	--

(Materiales)

Biorreactor Bionet F3 MB-100	1 ud	150610,00	150610,00
------------------------------	------	-----------	-----------

Total 150610,00

3 % Costes indirectos 4518,30

155128,30

EPÍGRAFE 2.3 FASE III

Orden	Uds.	Descripción	Rendimiento	Precio (€)	Subtotal	Importe (€)
2.3.1	Ud.	Sistema de liofilización Kemolo FD-50. Incluye el transporte, instalación, puesta en marcha y prueba del equipo en las instalaciones del cliente.				
		(Materiales)				
		Liofilizador Kemolo FD-50	1,00 ud	49991,94	49991,94	
		Total			49991,94	
		3 % Costes indirectos			1499,76	
						51491,70
2.3.2	Ud.	Bandeja de liofilización Teclen® Lyoprotect® LPMU-V2740B-WS para liofilización a granel.				
		(Materiales)				
		Bandejas Teclen® Lyoprotect® LPMU-V2740B-WS de 1,8 l.	1,00 ud	148,00	148,00	
		Juntas de bandeja LPMU-V1622-FD.	1,00 ud	8,00	8,00	
		Total			156,00	
		3 % Costes indirectos			4,68	
						160,68
2.3.3	Ud.	Sistema de refrigeración con cámara frigorífica (0°-6°C) Impafri de dimensiones 1,76 (L) x 1,36 (F) x 2,28 (A) metros, con un espesor de panel de 80 mm, sin suelo y equipada con una estantería de cuatro niveles y dimensiones 1,60 (L) x 0,37 (F) x 1,67 (A) metros. Incluye el transporte.				
		(Materiales)				

DOCUMENTO Nº5. PRESUPUESTOS

	Cámara frigorífica Impafri	1,00 ud	4178,02	4178,02
	(Mano de obra)			
	Oficial instalador	4,50 h	25,60	115,20
	Peón especializado	4,50 h	21,82	98,19
%CD	Medios auxiliares	3 % Costes directos		131,74
			Total	4523,15
		3 % Costes indirectos		135,69
				4658,84

EPÍGRAFE 2.4 OTROS

Orden	Uds.	Descripción	Rendimiento	Precio (€)	Subtotal	Importe (€)
2.4.1	Ud.	Garrafas de polipropileno de 10 litros esterilizables en autoclave Thermo Scientific™ Nalgene™, de 39 cm de altura y 22,5 cm de diámetro exterior. Incluye el envío.				
		(Materiales)				
		Garrafas Thermo Scientific™ Nalgene™, de 10 litros.	1,00 ud	68,03	68,03	
				Total	68,03	
			3,00 % Costes indirectos		2,04	
						70,07

2.4.2 Ud. Carro de servicio en acero inoxidable AISI 304, de dos niveles y capacidad de carga de 100 kg y medidas 890 (L) x 590 (F) x 950 (A) mm.

(Materiales)

Carro de servicio en acero inoxidable AISI 304.	1,00 ud	206,66	206,66
		Total	206,66

3,00 % Costes indirectos 6,20

212,86

- 2.4.3 Ud. Contenedor de basuras de 770 litros de capacidad, con tapa plana. Equipado con ruedas y frenos. Envío gratuito.

(Materiales)

Contenedor de basura de 770 l con tapa plana, ruedas y frenos.	1,00 ud	220,00	220,00
----------------------------------------------------------------	---------	--------	--------

Total 220,00

3,00 % Costes indirectos 6,60

226,60

- 2.4.4 Ud. Taquilla metálica individual, para uso individual con llave, colocada

Materiales

Taquilla metálica individual	1,00 ud	77,13	77,13
------------------------------	---------	-------	-------

Total 77,13

3,00 % Costes indirectos 2,31

79,44

- 2.4.5 Ud. Banco de madera capacidad para 5 personas

Materiales

Banco de madera	1,00 ud	45,55	45,55
-----------------	---------	-------	-------

Total 45,55

3,00 % Costes indirectos 1,37

46,92

- 2.4.6 Ud. Adquisición (instalación incluida) de caseta multiusos, paneles de relleno con esquinas redondeadas. 3,28 m (L) x 3 m (An)

Materiales

DOCUMENTO Nº5. PRESUPUESTOS

Caseta modular multiusos de interior. 3,28 m (L) x 3 m (An)	1,00 ud	5300,00	5300,00
			Total 5300,00
3,00 % Costes indirectos			159,00
			5459,00

2.4.7 Ud. Mesa de madera con capacidad para 10 personas

Materiales

Mesa de madera para 10 personas	1,00 ud	108,63	108,63
			Total 108,63
3,00 % Costes indirectos			3,26
			111,89

CAPÍTULO. III. SEGURIDAD Y SALUD

EPÍGRAFE 3.1 SEGURIDAD

Orden	Uds.	Descripción	Rendimiento	Precio (€)	Subtotal	Importe (€)
3.1.1	Ud.	Extintor portátil de nieve carbónica CO ₂ , de eficacia 34B, con 2 kg de agente extintor, vaso difusor, según la norma UNE 23110.				
		(Materiales)				
		Extintor portátil de nieve carbónica (2 kg).	1,00 ud	94,55	94,55	
		(Mano de obra)				
		Peón instalador	0,10 h	21,82	2,18	
					Total	96,73
3 % Costes indirectos						2,90
						99,63

3.1.2 Ud. Bloque alumbrado de emergencia incandescente decorativo IP65, funcionamiento emergencia-señalización

con lámpara de 8 w, autonomía superior a 3 horas,
instalado

(Materiales)

Bloque alumbrado IP65 – 8 w.	1,00 ud.	157,25	157,25
------------------------------	----------	--------	--------

Total 157,25

3,00 % Costes indirectos 4,72

161,97

3.1.3 Ud. Cartel indicativo de riesgo sin soporte. Colocado.

(Materiales)

Cartel indicativo de riesgo.	1,00 ud	3,47	3,47
------------------------------	---------	------	------

Total 3,47

3,00 % Costes indirectos 0,10

3,57

EPÍGRAFE 3.2 SALUD

Orden	Uds.	Descripción	Rendimiento	Precio (€)	Subtotal	Importe (€)
3.2.1	Ud.	Botiquín de primeros auxilios. Contiene lo establecido en el Real Decreto 486/1997				
		(Materiales)				
		Botiquín primeros auxilios.	1,00 ud	51,81	51,81	
				Total	51,81	
				3 % Costes indirectos	1,55	
						53,36

PRESUPUESTOS PARCIALES**CAPÍTULO. I. TRABAJOS PREVIOS****EPÍGRAFE 1.1 IDENTIFICACIÓN GENÉTICA**

Orden	Ud	Descripción	Medición				Precio (€)	Importe parcial (€)
1.1.1	Prep	Proceso de extracción del material genético (ADN) de las muestras número uno y dos, siguiendo el protocolo indicado por kits específicos.						
			Uds.	Ancho	Largo	Alto		
			1				34,01	34,01
1.1.2	Prep.	Proceso de amplificación del ADN de las muestras uno y dos mediante la realización de PCR.						
			Uds.	Ancho	Largo	Alto		
			1				73,94	73,94
1.1.3	Prep.	Proceso de amplificación del ADN de las muestras tres y cuatro mediante la realización de PCR.						
			Uds.	Ancho	Largo	Alto		
			1				76,28	76,28
1.1.4	Prep.	Consecución de la técnica molecular de electroforesis para la confirmación y evaluación de la amplificación del ADN de las cuatro muestras.						
			Uds.	Ancho	Largo	Alto		
			1				45,71	45,71
1.1.5	Mues.	Secuenciación genética para la identificación del género y especie de muestras de ADN, llevado a cabo por parte de la empresa STAB Vida.						
			Uds.	Ancho	Largo	Alto		
			4				5,31	21,24
TOTAL, IDENTIFICACIÓN GENÉTICA								251,18

EPÍGRAFE 1.2 PRUEBA PRODUCCIÓN EN SÓLIDO *TRICHODERMA SPP.*

Orden	Ud	Descripción	Medición			Precio (€)	Importe parcial (€)
1.2.1	Cult.	Preparación del inóculo en placa Petri, mediante cultivo en medio sólido (PDA) de una muestra de <i>Trichoderma spp.</i>					
			Uds.	Ancho	Largo	Alto	
			2				4,96
							9,92
1.2.2	Cult.	Preparación del inóculo en medio líquido (PDB) de una muestra de <i>Trichoderma spp.</i>					
			Uds.	Ancho	Largo	Alto	
			2				18,64
							37,28
1.2.3	Prep.	Preparación del trigo integral para su uso como medio de cultivo en la prueba de producción en estado sólido.					
			Uds.	Ancho	Largo	Alto	
			1				14,68
							14,68
1.2.4	Prep.	Preparación del centeno integral para su uso como medio de cultivo en la prueba de producción en estado sólido.					
			Uds.	Ancho	Largo	Alto	
			1				14,56
							14,56
1.2.5	Prep.	Preparación de la cebada integral para su uso como medio de cultivo en la prueba de producción en estado sólido.					
			Uds.	Ancho	Largo	Alto	
			1				14,59
							14,59
1.2.6	Prep.	Preparación del arroz integral para su uso como medio de cultivo en la prueba de producción en estado sólido.					
			Uds.	Ancho	Largo	Alto	
			1				25,68
							25,68
1.2.7	Med.	Medición del número de unidades formadoras de colonia (UFC) de cada medio utilizado.					
			Uds.	Ancho	Largo	Alto	
			4				12,88
							51,52
TOTAL, PRUEBA PRODUCCIÓN EN SÓLIDO DE <i>TRICHODERMA SPP.</i>							168,23

Alumno: Rodrigo Herrera Sanz
 UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (CAMPUS DE PALENCIA). E.T.S. de Ingenierías Agrarias
 Titulación: Grado en Ingeniería Forestal y del Medio Natural

CAPÍTULO. II. LÍNEA DE PRODUCCIÓN**EPÍGRAFE 2.1 FASE I**

Orden	Ud	Descripción	Medición	Precio (€)	Importe parcial (€)		
2.1.1	Uds.	Sistema autoclave/esterilizador modelo Celitron Azteca A-456 de alta capacidad. Incluye la entrega, instalación y formación de personal.					
		Uds.	Ancho	Largo	Alto		
		1				52185,53	52185,53
2.1.2	Uds.	Sistema de biofermentación Bionet F1 MB de 3 litros. Incluye el embalaje, transporte, instalación y formación de personal.					
		Uds.	Ancho	Largo	Alto		
		1				31816,70	31816,70
2.1.3	Uds.	Fregadero industrial de acero inoxidable AISI 304 18/10, de 700 mm de fondo, equipado con una cuba de dimensiones 860 x 500 x 380 mm y una capacidad de 163,4 litros. Incluye el envío a las instalaciones del cliente.					
		Uds.	Ancho	Largo	Alto		
		2				573,86	1147,72
TOTAL, FASE I					85149,95		

EPÍGRAFE 2.2 FASE II

Orden	Ud	Descripción	Medición	Precio (€)	Importe parcial (€)		
2.2.1	Ud.	Sistema de biofermentación Bionet F2 MB de 30 litros. Incluye el embalaje, transporte, instalación y formación del personal.					
		Uds.	Ancho	Largo	Alto		
		1				92690,00	92690,00
2.2.2	Ud.	Sistema de biofermentación Bionet F3 MB de 100 litros. Incluye el embalaje, transporte, instalación y formación del personal.					
		Uds.	Ancho	Largo	Alto		
		1				155128,30	155128,30
TOTAL, FASE II					247818,30		

Alumno: Rodrigo Herrera Sanz

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (CAMPUS DE PALENCIA). E.T.S. de Ingenierías Agrarias

Titulación: Grado en Ingeniería Forestal y del Medio Natural

EPÍGRAFE 2.3 FASE III

Orden	Ud	Descripción	Medición	Precio (€)	Importe parcial (€)	
2.3.1	Uds.	Sistema de liofilización Kemolo FD-50. Incluye el transporte, instalación, puesta en marcha y prueba del equipo en las instalaciones del cliente.				
		Uds.	Ancho	Largo	Alto	
		1				51491,70
						51491,70
2.3.2	Uds.	Bandeja de liofilización Teclen® Lyoprotect® LPMU-V2740B-WS para liofilización a granel.				
		Uds.	Ancho	Largo	Alto	
		36				160,68
						5784,48
2.3.2	Uds.	Sistema de refrigeración con cámara frigorífica (0°-6°C) Impafri de dimensiones 1,76 (L) x 1,36 (F) x 2,28 (A) metros, con un espesor de panel de 80 mm, sin suelo y equipada con una estantería de cuatro niveles y dimensiones 1,60 (L) x 0,37 (F) x 1,67 (A) metros. Incluye el transporte.				
		Uds.	Ancho	Largo	Alto	
		1				4658,84
						4658,84
TOTAL, FASE III					61935,02	

EPÍGRAFE 2.4 OTROS

Orden	Ud	Descripción	Medición	Precio (€)	Importe parcial (€)	
2.4.1	Uds.	Garrafas de polipropileno de 10 litros esterilizables en autoclave Thermo Scientific™ Nalgene™, de 39 cm de altura y 22,5 cm de diámetro exterior. Incluye el envío.				
		Uds.	Ancho	Largo	Alto	
		15				70,07
						1051,05
2.4.2	Uds.	Carro de servicio en acero inoxidable AISI 304, de dos niveles y capacidad de carga de 100 kg y medidas 890 (L) x 590 (F) x 950 (A) mm.				
		Uds.	Ancho	Largo	Alto	
		2				212,86
						425,72
2.4.3	Uds.	Contenedor de basuras de 770 litros de capacidad, con tapa plana. Equipado con ruedas y frenos. Envío gratuito.				

DOCUMENTO N°5. PRESUPUESTOS

		Uds.	Ancho	Largo	Alto			
		5				226,60	1133,00	
2.4.4	Uds.	Taquilla metálica individual, para uso individual con llave, colocada						
		4				79,44	79,44	
2.4.5	Uds.	Banco de madera capacidad para 5 personas						
		1				46,92	46,92	
2.4.6	Uds.	Caseta multiusos, paneles de relleno con esquinas redondeadas. 3,28 m (L) x 3 m (An)						
		1				5459,00	5459,00	
2.4.7	Uds.	Mesa de madera con capacidad para 10 personas						
		1				111,89	111,89	
TOTAL, OTROS							8307,02	

CAPÍTULO. III. SEGURIDAD Y SALUD**EPÍGRAFE 3.1 SEGURIDAD**

Orden	Ud	Descripción	Medición			Precio (€)	Importe parcial (€)
3.1.1	Uds.	Extintor portátil de nieve carbónica CO ₂ , de eficacia 34B, con 2 kg de agente extintor, vaso difusor, según la norma UNE 23110.					
			Uds.	Ancho	Largo	Alto	
			3				
						99,63	298,89
3.1.2	Uds.	Bloque alumbrado de emergencia incandescente decorativo IP65, funcionamiento emergencia-señalización con lámpara de 8 w, autonomía superior a 3 horas, instalado					
			Uds.	Ancho	Largo	Alto	
			1				
						161,97	161,97
3.1.3	Uds.	Cartel indicativo de riesgo sin soporte. Colocado.					
			Uds.	Ancho	Largo	Alto	
			8				
						3,57	28,56
TOTAL, SEGURIDAD							489,42

EPÍGRAFE 3.2 SALUD

Orden	Ud	Descripción	Medición			Precio (€)	Importe parcial (€)
3.1.1	Uds.	Botiquín de primeros auxilios. Contiene lo establecido en el Real Decreto 486/1997					
			Uds.	Ancho	Largo	Alto	
			1				
						53,36	53,36
TOTAL, SALUD							53,36

RESUMEN PRESUPUESTOS PARCIALES

DENOMINACIÓN	IMPORTE (€)
EPÍGRAFE 1.1 IDENTIFICACIÓN GENÉTICA	251,18
EPÍGRAFE 1.2 PRUEBA PRODUCCIÓN EN SÓLIDO <i>TRICHODERMA SPP.</i>	168,23
EPÍGRAFE 2.1 FASE I	85149,95
EPÍGRAFE 2.2 FASE II	247818,30
EPÍGRAFE 2.3 FASE III	61935,02
EPÍGRAFE 2.4 OTROS	8307,02
EPÍGRAFE 3.1 SEGURIDAD	489,42
EPÍGRAFE 3.2 SALUD	53,56

PRESUPUESTO GENERAL

DENOMINACIÓN	IMPORTE (€)
EPÍGRAFE 1.1 IDENTIFICACIÓN GENÉTICA	251,18
EPÍGRAFE 1.2 PRUEBA PRODUCCIÓN EN SÓLIDO <i>TRICHODERMA SPP.</i>	168,23
EPÍGRAFE 2.1 FASE I	85149,95
EPÍGRAFE 2.2 FASE II	247818,30
EPÍGRAFE 2.3 FASE III	61935,02
EPÍGRAFE 2.4 OTROS	8307,02
EPÍGRAFE 3.1 SEGURIDAD	489,42
EPÍGRAFE 3.2 SALUD	53,56
PRESUPUESTO GENERAL DE EJECUCIÓN MATERIAL	404172,67

El Presupuesto de Ejecución Material (PEM) del proyecto asciende a 404172,67€. A este hay que añadirle el presupuesto invertido en los materiales y equipos de seguridad y salud, no incluidos en el PEM, por no considerarse componentes de la línea de producción. Este asciende a 493,38 €.

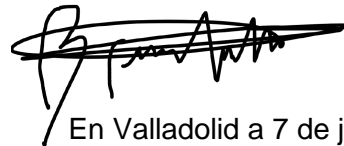
El total del Presupuesto de Ejecución Material del proyecto asciende a CUATROCIENTOS CUATRO MIL SEISCIENTOS SESENTA Y SEIS EUROS Y DICEISIETE CÉNTIMOS (404666,05 €).

PRESUPUESTO DE EJECUCIÓN POR CONTRATA

Presupuesto de Ejecución Material (PEM) total	404666,05 €
Gastos Generales de la Empresa (13 % del PEM)	52606,59 €
Beneficio Industrial (6 % del PEM)	24279,96 €
TOTAL, PARCIAL	481552,60 €
I.V.A. (21 % del TOTAL PARCIAL)	101126,05 €
TOTAL, PRESUPUESTO DE EJECUCIÓN POR CONTRATA	582678,65€

El presupuesto total de ejecución por contrata del proyecto titulado "Proyecto de diseño de una línea de producción de hongos y bacterias para la mejora de suelos forestales." asciende a QUINIENTOS OCHENTA Y DOS MIL SEISCIENTOS SETENTA Y OCHO EUROS Y SESENTA Y CINCO CÉNTIMOS (582678,65 €)

FDO. RODRIGO HERRERA SANZ



En Valladolid a 7 de junio de 2020