



**Validación del tiempo de vigencia de medios de cultivo, a través de la prueba de promoción
y crecimiento en superficie.**

Jessica Pamplona Lotero

Informe de práctica para optar al título de Ingeniero Bioquímico

Asesores

Jerónimo Osorio Echavarría, Magíster (MSc) en Ingeniería

Gonzalo Andrés Suarez Jaimes, Magíster (MSc) en Calidad y Gestión Integral

Universidad de Antioquia

Facultad de Ingeniería

Ingeniería Bioquímica

El Carmen de Viboral, Antioquia, Colombia

2022

Cita	(Pamplona Lotero, 2022)
Referencia	Pamplona Lotero, J. (2022). <i>Validación de la vigencia de medios de cultivo, a través de la prueba de promoción y crecimiento en superficie</i> . [Trabajo de grado profesional]. Universidad de Antioquia, El Carmen de Viboral, Colombia.
Estilo APA 7 (2020)	



Biblioteca Seccional Oriente (El Carmen de Viboral)

Repositorio Institucional: <http://bibliotecadigital.udea.edu.co>

Universidad de Antioquia - www.udea.edu.co

Rector: John Jairo Arboleda Céspedes

Decano/Director: Jesús Francisco Vargas Bonilla

Jefe departamento: Lina María González Rodríguez

El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Antioquia ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por los derechos de autor y conexos.

Tabla de contenido

Resumen	8
Abstract	8
1. Introducción	9
2. Objetivos	9
2.1. Objetivo general	9
2.2. Objetivos específicos.....	9
3. Marco teórico	10
3.1. Clasificación de los medios de cultivo	10
Según el estado físico.....	10
Según la promoción del crecimiento de determinados microorganismos	11
3.2. Almacenamiento y conservación de los medios preparados	11
3.3. Pruebas de control	12
3.3.1. Control de esterilidad	12
3.3.2. Pruebas de inspección visual.....	12
3.3.3. Promoción de crecimiento.....	12
3.3.4. Estandarización del inóculo por medio de densidad óptica	13
3.3.5. Cepas de referencia	13
3.3.6. Productividad cualitativa.....	14
3.3.7. Selectividad cualitativa	14
3.3.8. Productividad cuantitativa.....	14
4. Metodología	16
4.1. Cultivos de trabajo	16
4.2. Suspensiones de trabajo estandarizadas	16
4.3. Dilución e inoculación	16

4.4.	Incubación	17
4.5.	Evaluación de los medios de cultivo	17
5.	Resultados y análisis	18
5.1.	Pruebas de inspección visual	18
5.2.	Promoción de crecimiento	19
5.2.1.	Medios sólidos no selectivos	19
5.2.2.	Medios líquidos no selectivos	20
5.3.	Selectividad	23
5.3.1.	Medios Sólidos	23
5.3.2.	Medios líquidos	26
5.4.	Relación de productividad cuantitativa	28
5.4.1.	Agar Casoy	29
5.4.2.	Agar Sabouraud	30
6.	Conclusiones	31
7.	Referencias	32

Lista de tablas

Tabla 1. Clasificación de los medios de cultivo	11
Tabla 2. Rango de densidad óptica para la estandarización de una suspensión de trabajo	13
Tabla 3. Cepas de referencia	14
Tabla 4. Medios para medir la productividad y selectividad.....	15
Tabla 5. Tiempo en el que se evaluó cada medio de cultivo	16
Tabla 6. Pruebas de inspección visual.....	18
Tabla 7. UFC presentes en los medios de cultivo sólidos no selectivos, tiempo 0	19
Tabla 8. UFC presentes en los medios de cultivo sólidos no selectivos, tiempo 1	19
Tabla 9. UFC presentes en los medios de cultivo sólidos no selectivos, tiempo 2	20
Tabla 10. Grado de turbidez presente en los medios de cultivo líquidos no selectivos, tiempo 0	20
Tabla 11. Grado de turbidez presente en los medios de cultivo líquidos no selectivos, tiempo 1	21
Tabla 12. Grado de turbidez presente en los medios de cultivo líquidos no selectivos, tiempo 2	22
Tabla 13. UFC presentes en los medios de cultivo sólidos selectivos, tiempo 0	23
Tabla 14. UFC presentes en los medios de cultivo sólidos selectivos, tiempo 1	23
Tabla 15. UFC presentes en los medios de cultivo sólidos selectivos, tiempo 2	24
Tabla 16. Prueba inhibitoria para medios de cultivo selectivos	24
Tabla 17. Grado de turbidez presente en los medios de cultivo líquidos selectivos, tiempo 0	26
Tabla 18. Grado de turbidez presente en los medios de cultivo líquidos selectivos, tiempo 1	26
Tabla 19. Grado de turbidez presente en los medios de cultivo líquidos selectivos, tiempo 2	27
Tabla 20. Relación de productividad de los medios de cultivo sólidos.....	28
Tabla 21. ANOVA de Agar Casoy.....	29
Tabla 22. Prueba de múltiples rangos en Agar Casoy.....	29
Tabla 23. ANOVA de Agar Sabouraud.....	30
Tabla 24. Prueba de múltiples rangos en Agar Sabouraud.....	30

Lista de figuras

Figura 1. Medio de cultivo Agar Manitol Sal. a). Inhibición de E. coli. y b). Crecimiento de S. aureus.	25
Figura 2. Selectividad del Agar cetrimide. a) Inhibición de E. coli. b) Crecimiento de P. aeruginosa.....	26
Figura 3. Caldo Mossel. a) Selectividad de E. coli, b) Selectividad de P. aeruginosa y c) Inhibición de S. aureus	27
Figura 4. Caldo MacConkey. a) Selectividad de E. coli. b) Inhibición de S. aureus	28

Siglas, acrónimos y abreviaturas

USP	The United States Pharmacopeia
PR	Relación de productividad
Ns	Recuento de colonias obtenidas en la superficie del medio de cultivo
No	Recuento de colonias en la superficie del medio de cultivo de referencia
\bar{x}	Valor promedio
α	Desviación estándar de una muestra
CV	Coefficiente de variación
REF	Medio de referencia
UFC	Unidades formadoras de colonias
ATCC	American Type Culture Collection
R1	Réplica uno
R2	Réplica dos
R3	Réplica tres

Resumen

En Corpaul Farmacéutica, los análisis de control microbiológico que se llevan a cabo deben cumplir con los estándares de calidad descritos en la Farmacopea de los estados Unidos (USP), por lo tanto, es de gran importancia que los medios de cultivo utilizados con esta finalidad sean capaces de proporcionar resultados reproducibles y consistentes. Por consiguiente, esta investigación consta en validar el tiempo de vigencia de los medios de cultivo que son empleados rutinariamente en el laboratorio de control microbiológico de Corpaul para ensayos y procedimientos, a partir de un inóculo estandarizado, aplicando la prueba de calidad de promoción y crecimiento en superficie. Se obtuvo que el porcentaje de relación de productividad en los medios de cultivo sólidos es mayor al 70% y los medios de cultivo líquidos alcanzan una turbidez intensa, lo que indica que hay un crecimiento satisfactorio. De modo que se determina que el tiempo de vigencia de los medios de cultivo analizados es de 30 días al conservarse a una temperatura de refrigeración de 2°C a 8°C.

Palabras clave: medios de cultivo, promoción de crecimiento, relación de productividad, tiempo de vigencia.

Abstract

At Corpaul Pharmaceuticals, the microbiological control analyzes that are carried out must comply with the quality standards described in the United States Pharmacopeia (USP), therefore, it is of great importance that the culture media used with this purpose can provide reproducible and consistent results. Therefore, this research consists of validating the validity time of the growing medium, that are routinely used in the microbiological control laboratory of Corpaul for tests and procedures, from a standardized inoculum, applying the growth promotion quality test on surface. It was obtained that the percentage of productivity in the solid growing medium is greater than 70%, and the liquid growing medium reach an intense turbidity, which indicates that there is a satisfactory growth. So, it is determined that the shelf life of the growing medium analyzed is 30 days when stored at a refrigeration temperature of 2°C to 8°C.

Keywords: growing medium, growth promotion, productivity, validity period.

1. Introducción

La validación de un procedimiento analítico es el proceso mediante el cual se establece, a través de estudios de laboratorio, que las características de rendimiento de la técnica cumplen los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas (USP 45 - NF 40., 2021). La evaluación de la calidad de medios de cultivo es un requerimiento esencial en los laboratorios de microbiología que determinan la confiabilidad de los resultados obtenidos en los análisis de producto. (Méndez et al., 2011), además, para que los medios de cultivo puedan ser empleados, se debe de establecer, el tiempo de vigencia del medio después de su preparación; esto se determina a partir de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP), la USP 45 <1225>. Por lo tanto, esta investigación consta en validar los medios de cultivo que son empleados rutinariamente en el laboratorio de Corpaul farmacéutica para ensayos y procedimientos, y verificar que estos, sean capaces de proporcionar resultados reproducibles y consistentes, de modo que los requisitos que han de reunir los medios de cultivo pueden ser específicos tanto de la muestra, como de los microorganismos que se van a detectar. Por consiguiente, un requisito previo para cualquier trabajo microbiológico fiable es que los medios de cultivo cumplan los criterios de rendimiento establecidos, como la aceptabilidad de cada lote de medio, la capacidad de proporcionar resultados consistentes y que sea adecuado para su uso. Estos tres criterios constituyen una parte esencial de los procedimientos de control interno de la calidad y, junto con la documentación adecuada, permitirán una supervisión eficaz de los medios de cultivo y contribuirán a la obtención de datos de precisión y confianza (AEN/CTN 34, 2014)

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Validar el tiempo de vigencia de los medios de cultivo a partir de un inóculo estandarizado, aplicando la prueba de calidad de promoción de crecimiento en superficie.

2.2. Objetivos específicos

- Estandarizar los inóculos descritos en la farmacopea de los Estados Unidos (USP 45 - NF 40).

- Establecer la vigencia de los medios de cultivo analizados y determinar la relación de productividad al emplear la prueba de calidad de promoción de crecimiento en superficie

3. Marco teórico

Un medio de cultivo es un conjunto de nutrientes, factores de crecimiento y otros compuestos que crean las condiciones necesarias para el desarrollo de los microorganismos. (Gutiérrez Romero et al., 2020). Para permitir el crecimiento de microorganismos en el laboratorio, es necesario aportarles un medio de cultivo con nutrientes y condiciones fisicoquímicas adecuadas para su metabolismo. Debido a la variabilidad de los resultados microbiológicos, el tema de los medios de cultivo juega un rol importante, junto a otros principios, dentro de las buenas prácticas de un laboratorio de Microbiología, ya que, si los medios de cultivo no están apropiadamente preparados y controlados, los resultados del laboratorio pueden mostrar errores. (Cerra et al., 2016).

3.1. Clasificación de los medios de cultivo

Los medios de cultivo pueden ser clasificados teniendo en cuenta criterios muy diversos. A continuación, se exponen algunas de las clasificaciones más difundidas.

Según el estado físico

- Medios líquidos: como se presentan en ese estado son llamados también caldos. (Cerra et al., 2016)
- Medios sólidos: se preparan a través de medios líquidos agregándoles un agente gelificante como el agar, un polímero de azúcares obtenido de algas marinas. Es una molécula insoluble en agua fría pero soluble en agua caliente. (Cerra et al., 2016)
- Medios semisólidos: se preparan a partir de los medios líquidos, agregándoles un agente solidificante en una proporción menor que los medios sólidos. (Cerra et al., 2016)

Según la promoción del crecimiento de determinados microorganismos

- Medios Selectivos: en su mayoría son sólidos, contienen sustancias que inhiben el crecimiento de determinados microorganismos, o sea, previene el crecimiento de especies acompañantes indeseables. (Rodríguez Martínez et al., 2018)
- Medios Diferenciales: Contienen distintos compuestos químicos o indicadores sobre los que determinados microorganismos adquiere coloraciones específicas o reaccionan de una manera determinada. (Aviles Gonzales et al., 2010)

En la tabla 1 se observa la clasificación de los medios de cultivo según la promoción del crecimiento de determinados microorganismos, que fueron sometidos a la validación del tiempo de vigencia.

Tabla 1. Clasificación de los medios de cultivo

Clasificación de los medios de cultivo	Medios de cultivo
Caldos de enriquecimiento no selectivos y Medios líquidos para dilución	Caldo digerido de caseína de soya (TSB)
	Caldo Tioglicolato Medio Fluido
	Caldo Neutralizante D/E
	Fluido A (Agua Peptona 0,1%)
Caldos selectivos	Caldo MacConkey
	Caldo Mossel
Agares no selectivos de recuento	Agar digerido de caseína de soya
	Agar Sabouraud Dextrosa
Agares de detección selectiva	Agar VRGB
	Agar MacConkey
	Agar Cetrimide
	Agar Manitol
	Agar Chromocult

3.2. Almacenamiento y conservación de los medios preparados

Una vez que el medio de cultivo ha sido preparado y esterilizado, se debe almacenar entre 2 y 8°C, a menos que el medio requiera alguna condición diferente. Se deben mantener en recipientes bien cerrados para evitar su deshidratación. (Aviles Gonzales et al., 2010)

3.3. Pruebas de control

La exactitud de un informe depende de la calidad de los medios y reactivos que se emplean en el análisis y del cuidado que se tuvo en su preparación y empleo, por lo que es ineludible que, para asegurar la calidad del medio preparado se efectúe un mínimo de pruebas de control que incluyan tanto determinaciones físicas como biológicas. (Campos, 2013)

3.3.1. Control de esterilidad

El control de la esterilidad de un lote de medio de cultivo es un indicativo de contaminación masiva y principalmente de origen bacteriano, por lo tanto, esta prueba se realiza sobre el 5% del lote preparado. Para llevar a cabo este procedimiento se incuban los medios de cultivo preparados durante un tiempo prolongado (entre 5 y 7 días) y a temperatura que favorezca el desarrollo de bacterias como de hongos (35 y 25 °C, respectivamente). El criterio de aceptación es que no debe haber crecimiento, por lo tanto, sí se presenta desarrollo se rechaza el lote. (Campos, 2013)

3.3.2. Pruebas de inspección visual

El primer punto por considerar en la evaluación de calidad de un medio de cultivo preparado es su aspecto, por lo que el medio de cultivo preparado no debe de presentar cambios de color, apariencia, deshidratación, hidratación, consistencia ni crecimiento microbiano.

3.3.3. Promoción de crecimiento

Para el análisis microbiológico de cualquier producto farmacéutico es necesario realizar la prueba de promoción de crecimiento de los medios de cultivo empleados de acuerdo con la USP. Debe realizarse en cada lote de medio de cultivo empleado. El propósito de esta técnica es verificar la susceptibilidad de los medios de cultivo. Esta prueba incluye prueba negativa, promoción del crecimiento y estudio de las propiedades inhibitorias. (Netpharmalab, 2017). Para llevar a cabo la promoción de crecimiento, se debe de tener en cuenta la preparación del inóculo, donde es necesario realizar la estandarización de este previamente a ser utilizado para inocular los medios de cultivo a evaluar en la promoción de crecimiento.

3.3.4. Estandarización del inóculo por medio de densidad óptica

La estandarización de las suspensiones de microorganismos proporciona una metodología de trabajo que facilita la obtención de los resultados esperados (Fiallos Núñez, 2017). La metodología para la cuantificación de microorganismos en microbiología suele estar apoyada de métodos instrumentales, que permitan la veracidad del contenido de unidades de bacterias viables presentes para establecer la correlación con muestras para ensayos que así lo requieran. (Aviles Gonzales et al., 2010)

Las técnicas turbidimétricas son métodos rápidos y eficaces para estimar el crecimiento celular en múltiples bioprocesos. La medición de turbidez se basa en los fenómenos ópticos que se originan al incidir un haz de luz a través de un medio; la presencia de partículas suspendidas produce una dispersión de la luz, lo que interfiere en el haz de luz resultante. Un método tradicional para las mediciones de turbidez es la escala McFarland (Fiallos Núñez, 2017), que consiste en obtener una suspensión de trabajo estandarizada, la cual es obtenida cuando la densidad óptica cumple con el siguiente rango previamente validado.

Tabla 2. Rango de densidad óptica para la estandarización de una suspensión de trabajo

<i>Microorganismo</i>	<i>Densidad óptica (McFarland)</i>	<i>Concentración</i>
Bacterias	[0,54] – [0,56]	1,5 UFC x10 ⁸ /mL
Hongos y levaduras	[3,0]	9 UFC x10 ⁸ /mL

Para realizar la medición de la densidad óptica de una suspensión de microorganismos es necesario hacer uso del Densichek Plus, este utiliza una única longitud de onda de 580 nm.

3.3.5. Cepas de referencia

Para la realización de la validación de inóculos es necesario contar con cepas cualitativas ATCC; Estas, ofrecen estándares microbianos producidos bajo los procesos acreditados por ISO 17034:2017 e ISO / IEC 17025:2017 y certificados por ISO 9001:2017. Estos materiales de referencia son trazables al cultivo original y tienen identidad confirmada, características bien definidas y una cadena de custodia establecida, esto, los hace ideales para su uso como estándares

biológicos con fines de investigación y desarrollo (ATCC, 2021). Las cepas de referencia que se emplearon se pueden observar en la tabla 3.

Tabla 3. Cepas de referencia

Microorganismo	ATCC
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739
<i>Clostridium sporogenes</i>	ATCC 11437
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	ATCC 16404

3.3.6. Productividad cualitativa

Método cualitativo (turbidez), por lo tanto, las calificaciones fueron sólo indicativas. Para esta prueba se utilizaron caldos selectivos y no selectivos, estos medios se encuentran clasificados en la tabla 1, junto con los microorganismos específicos que se observan en la tabla 4 para cada medio de cultivo.

3.3.7. Selectividad cualitativa

La finalidad de este ensayo de rendimiento fue verificar que las cepas de referencia se inhiben de forma total o parcial por el medio selectivo, se usaron por lo tanto los caldos selectivos y medios solidos selectivos que se encuentran en la tabla 1 con el microorganismo específico de cada uno.

3.3.8. Productividad cuantitativa

Método de siembra en superficie, el cuál es cuantitativo para pruebas de rendimiento de medios solidos no selectivos para recuento, los cuales se encuentran en la tabla 1. La recuperación del medio de cultivo evaluado se comparó con la recuperación de un medio de cultivo de referencia.

El PR debe de ser mayor al 70% para la comparación de un medio no selectivo con un medio de referencia no selectivo.

Para cada una de las pruebas específicas se emplearon los microorganismos de cada medio de cultivo que se encuentra en la tabla 4, a unas condiciones de temperatura y tiempo de incubación específica.

Tabla 4. Medios para medir la productividad y selectividad

Medio de cultivo	Microorganismos	Temperatura de Incubación	Tiempo de Incubación
Caldo digerido de caseína de soya (TSB) Caldo Neutralizante D/E Fluido A (Agua Peptona 0,1%)	<i>S. aureus</i>	30 °C -35 °C	≤ 3 días
	<i>P. aeruginosa</i>		
	<i>B. subtilis</i>		
	<i>C. albicans</i> <i>A. brasiliensis</i>		
Caldo Tioglicolato Medio Fluido	<i>S. aureus</i>	30 °C -35 °C	≤ 3 días
	<i>P. aeruginosa</i>		
	<i>C. sporogenes</i>		
Caldo MacConkey	<i>E. coli</i>	42°C -44°C	≤ 48 h
	<i>S. aureus</i>		
Caldo Mossel	<i>E. coli</i>	30 °C -35 °C	≤ 48 h
	<i>P. aeruginosa</i>		
	<i>S. aureus</i>		
Agar digerido de caseína de soya	<i>S. aureus</i>	30 °C -35 °C	≤ 3 días
	<i>P. aeruginosa</i>		
	<i>B. subtilis</i>		
	<i>C. albicans</i> <i>A. brasiliensis</i>		
Agar Sabouraud Dextrosa	<i>A. brasiliensis</i>	30 °C -35 °C	≤ 5 días
	<i>C. albicans</i>		
Agar VRGB	<i>E. coli</i>	30 °C -35 °C	≤ 24 h
Agar cetrimide	<i>P. aeruginosa</i>		
Agar Manitol	<i>E. coli</i>	30 °C -35 °C	≤ 72 h
	<i>S. aureus</i>		

4. Metodología

En primer lugar, se definieron los tiempos de evaluación de los medios de cultivo, donde se evaluaron en tres tiempos diferentes, empezando el día cero, el cuál fue el día en que se preparó el medio de cultivo, seguido del tiempo uno, donde se realizaron las pruebas 15 días después de la preparación del medio y, por último, se evaluó cada medio en el tiempo dos, a los 30 días de preparación.

Tabla 5. Tiempo en el que se evaluó cada medio de cultivo

<i>Tiempo (días)</i>		
0	15	30
<i>T° ambiente</i>	<i>T° refrigeración</i>	

4.1. Cultivos de trabajo

Con el fin de obtener las cepas de trabajo se realizó la activación de las cepas cualitativas a partir de un Kwik-stik, por lo tanto, para bacterias se empleó el medio de cultivo digerido de caseína de soya y para la activación de las cepas de hongos y levaduras se utilizó Agar Sabouraud. Pasado el tiempo de incubación, se almacenaron en la nevera a una temperatura de 2 a 8°C por un tiempo de 10 días.

4.2. Suspensiones de trabajo estandarizadas

Se tomaron tres frascos Schott con 50 mL de cloruro de sodio al 0.9% estéril, luego, se les adicionó dos asadas del cultivo de trabajo para enturbiar y se agitó en el vórtex para homogeneizar la muestra, estas suspensiones microbianas obtenidas se leyeron en el Densichek hasta obtener los valores de densidad óptica que se observan en la tabla 2.

4.3. Dilución e inoculación

Al obtener la suspensión de microorganismos estandarizada, se llevaron a cabo las diluciones seriadas hasta que se obtuvo una dilución de 10^{-5} , obteniendo así, una concentración

de $1,5 \times 10^3$ UFC/mL; de esta dilución se inoculó en el medio sólido un volumen de 0,1 mL y un volumen de 1 mL para los caldos.

4.4. Incubación

Las cajas bacterianas se incubaron a 32.5°C durante 24 a 48 horas, para los hongos y levaduras a 22.5°C durante 3 a 5 días y *Clostridium sporogenes* se incubó en una cámara de anaerobiosis a 32.5°C durante 3 días.

4.5. Evaluación de los medios de cultivo

La evaluación de los medios de cultivo se hizo con respecto a las pruebas descritas anteriormente, pruebas de inspección visual, promoción de crecimiento, selectividad y productividad, además se realizó la medición de pH. Después del tiempo de incubación, se realizó una evaluación cualitativa visual inspeccionando si la turbidez es buena según la siguiente notación:

- 0 correspondió a ausencia de turbidez
- 1 correspondió a turbidez débil
- 2 correspondió a turbidez intensa.

El resultado fue rotulado con un 2 al haber crecimiento satisfactorio en un medio de cultivo en el que se utilizó un inóculo ≤ 100 UFC de los microorganismos evaluados en la prueba de productividad cualitativa.

El resultado fue rotulado con un 0 al haber ausencia de turbidez en un medio de cultivo en el que se utilizó un inóculo ≤ 100 UFC de los microorganismos evaluados en la prueba de selectividad cualitativa.

Para los métodos cuantitativos, la relación de productividad, PR se determinó mediante la fórmula:

$$PR = \frac{N_s}{N_o} \times 100$$

5. Resultados y análisis

A continuación, se presentan los resultados obtenidos en la validación de la vigencia de medios de cultivo, según las pruebas realizadas.

5.1. Pruebas de inspección visual

Se observan en la tabla 6 los resultados obtenidos de las pruebas de inspección visual realizadas a cada lote, donde se evaluó en tres tiempos diferentes (0, 15 y 30 días), que no mostrara cambios de color ni de apariencia, sin signos de deshidratación ni hidratación, además de evaluar que la consistencia no cambiara y este no presentara crecimiento microbiano en ningún medio preparado.

Tabla 6. Pruebas de inspección visual

Medio de cultivo	Cambio color	Cambio apariencia	Deshidratación	Hidratación	Consistencia	Crecimiento microbiano
Agar Casoy	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Agar Sabouraud	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Agar Chromocoult	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Agar Manitol sal	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Agar Cetrimide	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Agar VRGB	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Agar MacConkey	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Caldo neutralizante D/E	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Caldo Casoy	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Caldo Tioglicolato	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Caldo Mossel	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Caldo MacConkey	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple

En la tabla 6 se observa que cada uno de los medios de cultivo evaluados cumplieron con todas las pruebas realizadas de inspección visual, por lo tanto, se concluye que los medios de cultivo cumplen con las características visuales para ser usados en los diferentes análisis del

laboratorio de microbiología a los 30 días de haber sido preparado y a condiciones de refrigeración a una temperatura entre 2 a 8°C.

5.2. Promoción de crecimiento

5.2.1. Medios sólidos no selectivos

En la tabla 7, 8 y 9, se observan las UFC que se presentaron en los medios de cultivo sólidos no selectivos, en los tiempos evaluados, además de la desviación estándar de los datos y el coeficiente de variación entre ellos.

Tabla 7. UFC presentes en los medios de cultivo sólidos no selectivos, tiempo 0

Medio de cultivo no selectivos	Microorganismos	Ref	Tiempo 0								
			Lote 1			Lote 2			Lote 3		
			\bar{x}	α	CV	\bar{x}	α	CV	\bar{x}	α	CV
Agar Casoy	<i>S. aureus</i>	52	56	1,00	1,79	52	2,08	4,03	53	3,21	6,03
	<i>P. aeruginosa</i>	66	63	1,53	2,41	60	2,52	4,17	61	2,65	4,34
	<i>B. subtilis</i>	58	53	2,31	4,33	57	2,00	3,51	59	3,06	5,21
	<i>C. albicans</i>	81	74	2,08	2,80	79	2,52	3,20	77	1,53	1,98
	<i>A. brasiliensis</i>	56	59	2,65	4,48	57	3,21	5,61	52	1,73	3,33
Agar Sabouraud	<i>C. albicans</i>	76	80	1,53	1,90	73	2,00	2,74	70	2,65	3,78
	<i>A. brasiliensis</i>	53	62	3,06	4,95	57	2,00	3,51	58	3,00	5,17

Tabla 8. UFC presentes en los medios de cultivo sólidos no selectivos, tiempo 1

Medio de cultivo no selectivos	Microorganismos	Ref	Tiempo 1								
			Lote 1			Lote 2			Lote 3		
			\bar{x}	α	CV	\bar{x}	α	CV	\bar{x}	α	CV
Agar Casoy	<i>S. aureus</i>	95	89	2,52	2,82	88	2,52	2,85	94	2,65	2,81
	<i>P. aeruginosa</i>	92	90	3,51	3,89	88	2,08	2,36	85	3,21	3,80
	<i>B. subtilis</i>	88	93	3,00	3,23	79	2,00	2,53	89	2,08	2,33
	<i>C. albicans</i>	58	60	2,08	3,45	62	2,00	3,23	51	2,08	4,11
	<i>A. brasiliensis</i>	75	63	2,65	4,20	57	1,53	2,70	58	3,61	6,22
Agar Sabouraud	<i>C. albicans</i>	54	58	2,08	3,61	51	1,53	3,01	59	2,65	4,48
	<i>A. brasiliensis</i>	55	54	2,52	4,69	49	1,53	3,10	58	2,52	4,36

Tioglicolato											
Medio Fluido	<i>C. sporogenes</i>	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Caldo	<i>S. aureus</i>	2	2	1	1	2	2	1	1	2	2
Tioglicolato	<i>P. aeruginosa</i>	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	<i>C. sporogenes</i>	1	1	2	2	2	1	2	2	2	1

Tabla 12. Grado de turbidez presente en los medios de cultivo líquidos no selectivos, tiempo 2

		Caldos no selectivos									
Medio de cultivo	Microorganismos	Ref	Lote 1			Lote 2			Lote 3		
			R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
Caldo Casoy	<i>S. aureus</i>	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	<i>P. aeruginosa</i>	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	<i>B. subtilis</i>	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	<i>C. albicans</i>	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	<i>A. brasiliensis</i>	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Caldo neutralizante D/E	<i>S. aureus</i>	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	<i>P. aeruginosa</i>	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	<i>B. subtilis</i>	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	<i>C. albicans</i>	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Fluido A (Agua Peptona 0,1%)	<i>A. brasiliensis</i>	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	<i>S. aureus</i>	2	2	2	2	1	1	1	2	1	1
	<i>P. aeruginosa</i>	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	<i>B. subtilis</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	<i>C. albicans</i>	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Caldo	<i>A. brasiliensis</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Tioglicolato	<i>S. aureus</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Medio Fluido	<i>P. aeruginosa</i>	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	<i>C. sporogenes</i>	2	1	2	1	2	2	2	2	2	1
Caldo	<i>S. aureus</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Tioglicolato	<i>P. aeruginosa</i>	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	<i>C. sporogenes</i>	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

A partir de una evaluación cualitativa de los medios líquidos se puede concluir que se obtuvo una turbidez intensa, lo cual indica que hubo un crecimiento satisfactorio en los medios de cultivo líquidos. Por lo que se infiere, que los caldos después de 30 días de almacenamiento a

condiciones de refrigeración de 2 a 8°C tuvieron buen crecimiento microbiano a partir de un inóculo ≤ 100 UFC de los microorganismos evaluados en la prueba de productividad cualitativa.

5.3. Selectividad

5.3.1. Medios Sólidos

Los medios sólidos selectivos los cuales fueron utilizados para realizar la prueba de selectividad se encuentran en la tabla 12, 13 y 14, cada uno de ellos, con los respectivos resultados, donde se tiene el promedio de las UFC obtenidas, la desviación estándar y el coeficiente de variación, cada medio fue evaluado con tres lotes diferentes.

Tabla 13. UFC presentes en los medios de cultivo sólidos selectivos, tiempo 0

Medio de cultivo selectivos	Microorganismos	Ref	Tiempo 0								
			Lote 1			Lote 2			Lote 3		
			\bar{x}	α	CV	\bar{x}	α	CV	\bar{x}	α	CV
Agar Manitol sal	<i>S. aureus</i>	81	82	1,53	1,86	79	2,08	2,65	82	3,51	4,27
Agar Cetrimide	<i>P. aeruginosa</i>	90	96	1,53	1,59	87	1,53	1,75	91	2,00	2,20
Agar VRGB	<i>P. aeruginosa</i>	76	75	1,53	2,05	76	1,53	2,02	79	1,53	1,93
	<i>E. coli</i>	82	83	1,53	1,83	87	1,53	1,76	77	6,24	4,11
Agar MacConkey	<i>E. coli</i>	93	83	2,08	2,50	92	1,53	1,67	97	1,15	1,19
Agar Chromocoult	<i>E. coli</i>	88	88	1,53	1,74	89	2,08	2,33	91	1,15	1,27

Tabla 14. UFC presentes en los medios de cultivo sólidos selectivos, tiempo 1

Medio de cultivo selectivos	Microorganismos	Ref *	Tiempo 1								
			Lote 1			Lote 2			Lote 3		
			\bar{x}	α	CV	\bar{x}	α	CV	\bar{x}	α	CV
Agar Manitol sal	<i>S. aureus</i>	72	73	1,53	2,10	71	1,53	2,16	69	2,00	2,90

Agar Cetrimide	<i>P. aeruginosa</i>	69	71	1,53	2,16	65	1,53	2,36	70	2,08	2,96
Agar VRGB	<i>P. aeruginosa</i>	63	62	1,53	2,45	61	1,53	2,52	61	2,65	4,34
	<i>E. coli</i>	71	75	1,53	2,03	67	1,53	2,27	68	2,65	3,89
Agar MacConkey	<i>E. coli</i>	65	62	1,15	1,85	67	2,00	2,99	68	2,52	3,72
Agar Chromocoult	<i>E. coli</i>	61	57	0,58	1,02	64	2,00	3,13	54	1,53	2,85

Tabla 15. UFC presentes en los medios de cultivo sólidos selectivos, tiempo 2

Medio de cultivo selectivos	Microorganismos	Ref *	Tiempo 2								
			Lote 1			Lote 2			Lote 3		
			\bar{x}	α	CV	\bar{x}	α	CV	\bar{x}	α	CV
Agar Manitol sal	<i>S. aureus</i>	58	53	2,08	3,95	54	2,08	3,83	51	1,53	2,98
Agar Cetrimide	<i>P. aeruginosa</i>	68	65	3,21	4,97	65	1,53	2,34	67	2,65	3,95
Agar VRGB	<i>P. aeruginosa</i>	58	52	2,52	4,81	52	1,53	2,92	52	1,53	2,96
	<i>E. coli</i>	58	57	2,00	3,51	62	1,00	1,61	55	2,31	4,22
Agar MacConkey	<i>E. coli</i>	93	83	2,08	2,50	92	1,53	1,67	97	1,15	1,19
Agar Chromocoult	<i>E. coli</i>	56	54	0,58	1,08	51	1,53	2,98	57	1,53	2,66

A partir de los resultados de UFC obtenidas, se observa que los medios tuvieron un buen crecimiento de los microorganismos.

A los medios selectivos se les evaluó su poder de inhibición a partir de una cepa estandarizada de *E. coli*, los resultados que se observan en la tabla 16, muestran que la inhibición de cada medio se dio correctamente al no crecer ninguna UFC.

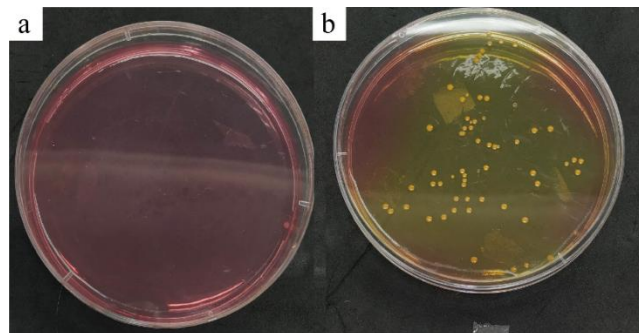
Tabla 16. Prueba inhibitoria para medios de cultivo selectivos

Medio de	Microorganismos	Productividad		
		Tiempo 0	Tiempo 1	Tiempo 2

cultivo selectivos		PR	PR	PR	PR	PR	PR	PR	PR	
		lote 1	lote 2	lote 3	lote 1	lote 2	lote 3	lote 1	lote 2	lote 3
Agar Manitol sal	<i>E. coli</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Agar Cetrimide	<i>E. coli</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Esto se debió a que el Agar Manitol Sal, es un medio altamente selectivo para el aislamiento primario de estafilococos patógenos, cuya composición incluye el alcohol polihidroxílico (manitol). Este sustrato permite la identificación de estafilococos coagulasa-positivos pertenecientes fundamentalmente a la especie *Staphylococcus aureus*, por su capacidad de fermentar el manitol, además, incluye en su composición el indicador de pH: rojo fenol. Este indicador es de color rojo a pH 8,2 y cambia a amarillo a pH por debajo de 6,8. Cuando se desarrollan las colonias de *Staphylococcus aureus* fermentadoras de manitol, se produce ácido en el medio, el cual reacciona con el indicador y forma las áreas de color amarillo alrededor de las colonias (Durán Vila et al., 2004). Esto se logra observar en la figura 1., donde a. es el ensayo de inhibición, y b corresponde a el crecimiento de *S. aureus* en el medio.

Figura 1. Medio de cultivo Agar Manitol Sal. a). Inhibición de *E. coli*. y b). Crecimiento de *S. aureus*.



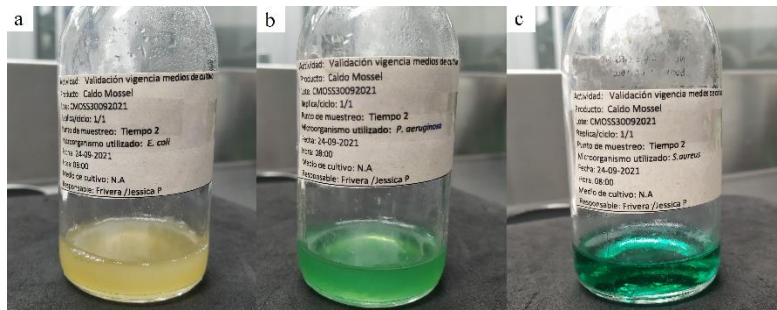
De igual forma, en la figura 2.a se logra observar que se inhibió completamente el crecimiento de *E. coli* en el Agar Cetrimide, en comparación con lo observado en la figura 2.b, donde se observa el crecimiento de *P. aeruginosa*, debido a que el Agar Cetrimide es un medio utilizado para el aislamiento selectivo de *Pseudomonas aeruginosa*, este estimula la formación de pigmentos y a su vez inhibe el crecimiento de otros microorganismos, como *E. coli*. El crecimiento microbiano de *Pseudomonas aeruginosa* induce un de color verde que corresponde a la producción de pioverdina. (Laboratorios Britania s.a., 2021)

Tabla 19. Grado de turbidez presente en los medios de cultivo líquidos selectivos, tiempo 2

Medio de cultivo	Microorganismos	Ref	Caldos selectivos								
			Lote 1			Lote 2			Lote 3		
			R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
Caldo Mossel	<i>S. aureus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>P. aeruginosa</i>	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	<i>E. coli</i>	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Caldo	<i>S. aureus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MacConkey	<i>E. coli</i>	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

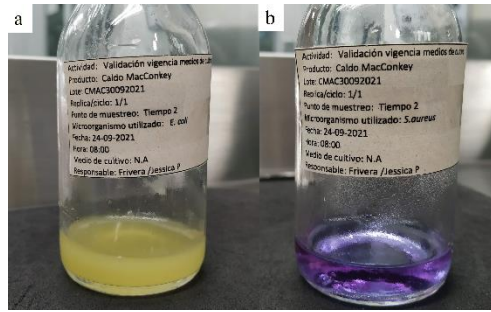
Los medios de cultivo líquidos, que tienen propiedades selectivas estimularon el crecimiento de una especie de bacteria concreta e inhibieron el de las otras, por lo tanto, se logró observar en el medio de cultivo, al haber crecimiento de la bacteria, se produjeron cambios de color y turbidez, sin embargo, al haber inhibición del microorganismo, no se presentó ningún cambio en el medio.

Esto se observa en la figura 3, donde el Caldo Mossel, promovió el crecimiento de *E. coli* y *P.aeruginosa* e inhibió el crecimiento de *S. aureus*, por lo que se logró apreciar en la figura 3.a el crecimiento de *E. coli*, generando un cambio de color de verde a amarillo, también se observó lo mismo en la figura 3.b, donde el crecimiento de *P. aeruginosa* generó un cambio de color de verde a verde con presencia de turbidez, sin embargo en la figura 3. c, se observó ausencia de turbidez, por lo tanto, se dice que el medio cumplió con los resultados esperados en la prueba de selectividad e inhibición.

Figura 3. Caldo Mossel. a) Selectividad de *E. coli*, b) Selectividad de *P. aeruginosa* y c) Inhibición de *S. aureus*

Por otro lado, como se observa en la figura 4, se evaluó el Caldo MacConkey, un caldo selectivo donde promueve el crecimiento de *E. coli* (a) e inhibió el crecimiento de *S. aureus* (b).

Figura 4. Caldo MacConkey. a) Selectividad de *E. coli*. b) Inhibición de *S. aureus*



5.4. Relación de productividad cuantitativa

La relación de productividad cuantitativa se le realizó a los medios de cultivo sólidos, en los tiempos 0, 1 y 2; en la tabla 20, se logra observar que la relación de productividad de cada medio es mayor al 70%, es decir, el tiempo de almacenamiento del medio de cultivo no afecta el porcentaje de recuperación de los medios, por lo tanto, se concluye que los medios de cultivo son aptos para ser usados después de 30 días de ser preparados y almacenados de 2 a 8°C, por lo tanto, se define que el tiempo de vigencia de los medios de cultivo evaluados en la validación es de 30 días.

Tabla 20. Relación de productividad de los medios de cultivo sólidos

Medio de cultivo selectivos	Microorganismos	Productividad								
		Tiempo 0			Tiempo 1			Tiempo 2		
		PR lote 1	PR lote 2	PR lote 3	PR lote 1	PR lote 2	PR lote 3	PR lote 1	PR lote 2	PR lote 3
Agar Casoy	<i>S. aureus</i>	108	99	103	94	93	99	96	95	103
	<i>P. aeruginosa</i>	96	91	92	98	96	92	100	95	96
	<i>B. subtilis</i>	92	98	101	106	90	102	99	101	95
	<i>C. albicans</i>	92	97	95	104	107	87	96	92	92
	<i>A. brasiliensis</i>	105	102	93	84	76	77	94	95	94
Agar Sabouraud	<i>C. albicans</i>	98	96	92	107	89	109	95	106	103
	<i>A. brasiliensis</i>	100	96	98	98	90	105	98	95	98

Agar Manitol sal	<i>S. aureus</i>	102	97	102	101	98	96	91	94	88
Agar Cetrimide	<i>P. aeruginosa</i>	107	97	101	102	94	102	95	96	99
Agar VRGB	<i>P. aeruginosa</i>	98	99	104	99	96	97	90	90	89
	<i>E. coli</i>	101	105	89	106	95	96	98	107	94
Agar MacConkey	<i>E. coli</i>	89	98	101	96	105	104	97	115	119
Agar Chromocoult	<i>E. coli</i>	99	101	103	93	105	88	96	92	102

Se utilizó el programa estadístico Statgraphics para realizar el análisis de varianza de los medios de cultivo sólidos no selectivos, es decir, Agar Casoy y Agar Sabouraud.

5.4.1. Agar Casoy

Tabla 21. ANOVA de Agar Casoy

Análisis de Varianza para Relación de productividad - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Microorganismo	340,8	4	85,2	2,16	0,0921
B:BLOQUE	119,244	2	59,6222	1,51	0,2335
RESIDUOS	1498,53	38	39,4351		
TOTAL (CORREGIDO)	1958,58	44			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

A partir de la tabla 21 se observa que los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que ningún valor-P es menor que 0,05, ninguno de los factores tiene un efecto estadísticamente significativo sobre Relación de productividad con un 95,0% de nivel de confianza.

Tabla 22. Prueba de múltiples rangos en Agar Casoy

Pruebas de Múltiple Rangos para Relación de productividad por Microorganismo

Método: 95,0 porcentaje LSD

Microorganismo	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
A. brasiliensi	9	91,1111	2,09325	X
P. aeruginosa	9	95,1111	2,09325	XX
C. albicans	9	95,7778	2,09325	XX
B. subtilis	9	98,2222	2,09325	X
S. aureus	9	98,8889	2,09325	X

No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. Por lo tanto, se concluye que entre los microorganismos utilizados para la inoculación del medio y el tiempo de uso de este después de preparado, no influye directamente en la relación de productividad del medio de cultivo.

5.4.2. Agar Sabouraud

Tabla 23. ANOVA de Agar Sabouraud

Análisis de Varianza para Relación de productividad - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Microorganismo	4,5	1	4,5	0,08	0,7809
B:BLOQUE	92,4444	2	46,2222	0,83	0,4580
RESIDUOS	783,333	14	55,9524		
TOTAL (CORREGIDO)	880,278	17			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

La tabla 23, los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que ningún valor-P es menor que 0,05, ninguno de los factores tiene un efecto estadísticamente significativo sobre Relación de productividad con un 95,0% de nivel de confianza.

Tabla 24. Prueba de múltiples rangos en Agar Sabouraud

Pruebas de Múltiple Rangos para Relación de productividad por Microorganismo

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>Microorganismo</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
C. albicans	9	100,889	2,49338	X
A. brasiliensi	9	101,889	2,49338	X

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. Por lo que se ha identificado un grupo homogéneo, según la alineación de las X's en columna. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. Por lo tanto, se concluye que Agar Sabouraud, no hay influencia directa de los factores, como el microorganismo utilizado y el tiempo de inoculación, entre la relación de productividad del medio de cultivo.

6. Conclusiones

En conclusión, se logró establecer un tiempo de vigencia de los medios de cultivo analizados por 30 días, debido a que los lotes de cada medio cumplieron con los análisis realizados, con respecto a las pruebas de inspección visual y al análisis de promoción de crecimiento del medio, donde se obtuvo así, un porcentaje de recuperación mayor al 70% y un grado de turbidez de 2. Estos medios de cultivo deben de ser almacenados a una temperatura de refrigeración entre 2°C a 8°C, para asegurar su conservación.

Al observar los datos obtenidos, se evidencia que la estandarización del inóculo, realizada según la USP, se preparó correctamente, ya que se obtuvieron resultados con datos en un rango de más de 50 UFC, pero menos de 100 UFC.

Los medios de cultivo sólidos cumplen con un porcentaje de relación de productividad mayor al 70%, por lo tanto, se dice que la relación de productividad es inversamente proporcional al tiempo de almacenamiento del medio de cultivo, es decir, el porcentaje de recuperación de UFC es independiente del tiempo que se ha conservado el medio en refrigeración, por tanto, se definió un tiempo de vigencia de 30 días para hacer uso de los medios preparados en Corpaul Farmacéutica.

Además, se concluye, que los medios de cultivo selectivos cumplen con las propiedades de inhibición y selectividad para asegurar el crecimiento de un microorganismo específico que se desee desarrollar en el laboratorio de control microbiológico.

7. Referencias

AEN/CTN 34. (2014). *Norma Internacional ISO 11133:2014*.

ATCC. (2021). *Materiales de referencia certificados*.

Aviles Gonzales, D. L., Delgado Espinales, K. R., & Gómez Valenzuela, A. G. (2010). *Correlación de suspensiones estandarizadas de microorganismos por el método turbidimétrico vs escala de Macfarland*.

Campos, J. E. (2013). *Evaluación de los medios de cultivo para verificar su reproductibilidad y selectividad*.

Cerra, H., Fernández, C., Horak, C., Lagomarsino, M., Torno, G., & Zarankin, E. (2016). *Manual de microbiología aplicada a las industrias farmacéutica, cosmética y de productos médicos*.

Durán Vila, A., Zhurbenko, R., & Viera Oramas, D. R. (2004). *Propuesta de una modificación en la formulación del medio agar manitol salado utilizado en el aislamiento de estafilococos de importancia clínica*.

Fiallos Núñez, J. E. (2017). *Determinación de la correlación entre Métodos Visuales, Ópticos y Difusión en placa en el Crecimiento de Escherichia coli*.

Gutiérrez Romero, A. L., Arellano Pimentel, B. E., Gutiérrez Iglesias, C., Escalera Zúñiga, E., Romero Díaz, G. A., Saucedo Constantino, J., González Moreno, J. O., Zamudio Duran, M. de la M., Martínez Flores, M. G., Ortiz de Montellano, M. G., & Flores Cabrera, Y. (2020). *Manual de Microbiología General I*.

Laboratorios Britania s.a. (2021). *Cetrimida Agar Base*.

Méndez, M. E., Quintos Escalante, M., & Herrera Benavides, A. (2011). *Control de calidad de medios de cultivo*.

Netpharmalab. (2017). *Control de medios de cultivo: Test de promoción de crecimiento*.
<https://netpharmalab.es/microbiologia/control-medios-cultivo/>

Rodríguez Martínez, C., Zhurbenko, R., Lobaina Rodríguez, T., Díaz Pérez, M., Viera Oramas, D. R., Alfonso Valdés, I., Brito González, A. I., Someillan Iglesias, D., & López Ricardo, Y. (2018). *Manual de medios de cultivo 2018*. www.biocen.cu

USP 45 - NF 40. (2021). <1225> *Validación de procedimientos compendiales*.