



**Somos calidad,
somos USC**

Determinación de la vigencia, la estabilidad y funcionalidad de medios de cultivo selectivos, no selectivos y fluidos de transporte en un laboratorio de microbiología farmacéutica.

Autor

Jose Ricardo Ordoñez Casadiegos

**Título por el que opta
Microbiólogo**

Directora

Pilar Cogua Romero

Codirectora

Adriana Correa

Facultad de Ciencias Básicas

Microbiología

Universidad Santiago de Cali

Santiago de Cali - Colombia

2025

IMPACTOS

Relacione el (los) impacto(s) que presentó el Trabajo de Grado

IMPACTO	PRODUCTO	BENEFICIARIO(S)
Económico	Optimización de recursos al extender la vida útil de los medios de cultivo preparados internamente	Empresa farmacéutica (reducción de costos de compra y descarte)
Responsabilidad social	Garantía de resultados microbiológicos confiables que respaldan la calidad de los medicamentos producidos	Pacientes, comunidad médica, autoridades regulatorias
Científico	Evidencia aplicada sobre la vigencia de medios de cultivo farmacéuticos, con respaldo normativo internacional (ISO 11133, USP)	Área de investigación y desarrollo de la empresa, comunidad científica
Indicadores de Gestión	Protocolos internos validados de control de calidad para medios de cultivo	Dirección de calidad, auditores internos y externos, entes regulatorios (INVIMA, EMA, FDA)
Tecnológico	implementación de metodologías estandarizadas de promoción de crecimiento y recuperación microbiana	Laboratorio de control de calidad microbiológica
Técnico	Procedimientos normalizados (SOPs) para la preparación, almacenamiento y verificación de medios	Analistas y técnicos de microbiología
Ambiental	Disminución de residuos biológicos y químicos al aprovechar medios vigentes durante todo su ciclo de vida	Empresa farmacéutica, comunidad, autoridades ambientales
Social	Confianza en la calidad de los medicamentos producidos mediante medios validados y confiables	Pacientes, profesionales de la salud, sociedad en general
Cultural	Fomento de una cultura organizacional basada en buenas prácticas de laboratorio (GMP, GLP) y sostenibilidad	Colaboradores de la empresa farmacéutica, sector productivo

DETERMINACIÓN DE LA VIGENCIA, LA ESTABILIDAD Y FUNCIONALIDAD DE MEDIOS DE CULTIVO SELECTIVOS, NO SELECTIVOS Y FLUIDOS DE TRANSPORTE EN UN LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA FARMACÉUTICA

Jose Ricardo Ordoñez Casadiegos

Grupo de investigación en Microbiología, Industrial y Medio Ambiente (GIMIA).
Universidad Santiago de Cali, Campus Pampalinda Calle 5 # 62-00. Santiago de Cali.
Colombia

RESUMEN

La determinación de la vigencia de los medios de cultivo representa un aspecto esencial en la industria farmacéutica, al garantizar la confiabilidad de los resultados microbiológicos y el cumplimiento de estándares internacionales como la ISO 11133, ISO 17025 y la USP <61>–<62>. En respuesta a la dependencia de medios importados y a la necesidad de optimizar recursos, este estudio tuvo como objetivo establecer el periodo de uso, estabilidad y funcionalidad de medios de cultivo sólidos, líquidos y fluidos de transporte preparados en un laboratorio de control de calidad microbiológica de una empresa farmacéutica. Los medios fueron elaborados bajo condiciones controladas siguiendo las especificaciones de las farmacopeas internacionales. Se evaluaron parámetros fisicoquímicos como pH, color, textura y aspecto, también parámetros microbiológicos como promoción de crecimiento, inhibición selectiva y recuperación; utilizando cepas de referencia certificadas. Se realizaron pruebas de ANOVA y post-hoc de Tukey, para determinar la existencia de variaciones significativas entre los distintos tiempos de evaluación (día 1, 15 y 30). Los resultados demostraron que todos los medios conservaron su apariencia física y estabilidad en el pH, con variaciones inferiores a 0,2 unidades. En las pruebas de promoción de crecimiento, los medios no selectivos, selectivos y los fluidos de transporte presentaron porcentajes de recuperación superiores al 70 %, cumpliendo con los criterios de aceptación internacionales. Los medios selectivos mantuvieron su capacidad inhibitoria y los fluidos de transporte preservaron la viabilidad microbiana dentro de los límites establecidos, sin diferencias estadísticas significativas ($p > 0,05$) durante los 30 días de almacenamiento. Aunque los análisis estadísticos demuestran diferencias significativas ($p < 0,05$) en algunos medios específicos (TSA, TSA +LP, R2A, EMB, VRBD, solución de fosfato Ph 7,2), no afectan de manera crítica el cumplimiento de los criterios de productividad y recuperación microbiológica. Los medios que presentaron diferencias mantuvieron valores dentro del rango aceptable (50–200 %), lo que sugiere que las variaciones se deben a factores de desempeño natural del medio y no a pérdida de estabilidad. Los resultados obtenidos en este estudio sirven como referencia para optimizar los procesos de fabricación y almacenamiento de medios de cultivo en laboratorios farmacéuticos, así como para futuras investigaciones orientadas a evaluar la estabilidad de los medios bajo diferentes condiciones ambientales, extensiones de vigencia o la inclusión de nuevas matrices de evaluación microbiológica, contribuyendo así al fortalecimiento de los sistemas de aseguramiento de la calidad en la industria farmacéutica.

Palabras clave: control de calidad microbiológica, promoción de crecimiento, vida útil, industria farmacéutica

DETERMINATION OF THE VALIDITY, STABILITY, AND FUNCTIONALITY OF SELECTIVE, NON-SELECTIVE, AND TRANSPORT MEDIA IN A PHARMACEUTICAL MICROBIOLOGY LABORATORY

ABSTRACT

Determining the shelf life of culture media is essential in the pharmaceutical industry, as it guarantees the reliability of microbiological results and compliance with international standards such as ISO 11133, ISO 17025, and USP <61>–<62>. In response to the dependence on imported media and the need to optimize resources, this study aimed to establish the period of use, stability, and functionality of solid, liquid, and transport media prepared in a microbiological quality control laboratory of a pharmaceutical company. The media were prepared under controlled conditions following the specifications of international pharmacopoeias. Physicochemical parameters such as pH, color, texture, and appearance were evaluated, as well as microbiological parameters such as growth promotion, selective inhibition, and recovery, using certified reference strains. ANOVA and Tukey's post-hoc tests were performed to determine the existence of significant variations between the different evaluation times (days 1, 15, and 30). The results showed that all media retained their physical appearance and pH stability, with variations of less than 0.2 units. In growth promotion tests, non-selective and selective media and transport fluids showed recovery rates of over 70%, meeting the acceptance criteria.

Keywords: microbiological quality control, growth promotion, shelf life, pharmaceutical industry

1. INTRODUCCIÓN

El aseguramiento de la calidad microbiológica constituye un eje esencial en la industria farmacéutica, ya que la presencia de microorganismos en materias primas, productos en proceso o terminados puede generar riesgos significativos para la seguridad del paciente y comprometer la eficacia terapéutica de los medicamentos [1, 5]. Con el fin de prevenir estos riesgos, los laboratorios deben implementar sistemas de control de calidad robustos, basados en metodologías estandarizadas y en el uso de insumos confiables, entre los cuales los medios de cultivo desempeñan un papel central en la detección, recuperación, enumeración e inhibición de microorganismos en diferentes ensayos (9, 14). Los medios de cultivo son sistemas complejos que integran componentes nutritivos específicos y agentes selectivos o diferenciales, diseñados para favorecer el crecimiento de determinados grupos microbianos mientras limitan otros. Su desempeño depende de múltiples factores, incluidos la composición química, la esterilización, las condiciones de almacenamiento y el tiempo transcurrido desde su preparación, lo que hace indispensable establecer su vigencia bajo condiciones controladas [7, 20, 21]. De acuerdo con la ISO 11133:2014, la preparación y almacenamiento de medios de cultivo requiere controles estrictos de pH, textura, aspecto y capacidad de recuperación de microorganismos de referencia, parámetros que deben mantenerse estables a lo largo del periodo de uso definido [7].

Las normativas internacionales como las farmacopeas, la OMS y las guías de ICH Q7 señalan la importancia de contar con medios de cultivo confiables en los laboratorios de control de calidad farmacéutica, ya que estos impactan directamente en la validez de los ensayos de esterilidad, enumeración microbiana y detección de microorganismos especificados [6, 10, 19, 20, 21, 22]. Asimismo, la ISO 17025 establece la necesidad de demostrar la competencia técnica de los laboratorios mediante la implementación de procedimientos que garanticen la reproducibilidad de los resultados (8). En este contexto, los medios de cultivo deben demostrar no solo productividad, sino también selectividad e idoneidad para cada aplicación, dentro de los límites definidos por estas regulaciones (12, 15). En Colombia, el INVIMA ha adoptado estas directrices como parte de sus requisitos de inspección y auditoría, con el fin de asegurar que los laboratorios de control de calidad que operan en la industria farmacéutica mantengan la confiabilidad de sus ensayos microbiológicos (10). No obstante, la mayoría de los laboratorios depende de medios de cultivo importados, lo que genera altos costos operativos y vulnerabilidad frente a retrasos en la cadena de suministro. Frente a esta problemática, la preparación interna de medios de cultivo en los laboratorios de control de calidad microbiológica se presenta como una alternativa viable para garantizar la continuidad de los análisis, reducir costos y aumentar la independencia operativa (11, 14).

En este marco, cobra relevancia la determinación de la vigencia de los medios de cultivo preparados internamente, entendida como la evaluación sistemática de su capacidad para conservar las propiedades fisicoquímicas (pH, color, textura, aspecto) y microbiológicas (promoción de crecimiento, inhibición selectiva y recuperación) a lo largo de un periodo de almacenamiento. Este enfoque no implica un proceso de validación, sino un análisis experimental destinado a establecer un tiempo de uso confiable que respalde la toma de decisiones en el laboratorio. Estudios recientes en entornos académicos y productivos han demostrado que los medios preparados en laboratorio pueden mantener su desempeño por periodos de hasta 30 días, siempre que se apliquen controles adecuados de producción y almacenamiento (9, 11, 48). De este modo, el presente trabajo se orienta a establecer la vigencia de los medios de cultivo sólidos, líquidos y fluidos de transporte preparados en el laboratorio de control de calidad microbiológica de una empresa farmacéutica, evaluando su comportamiento durante 30 días bajo condiciones controladas. Este análisis permite fortalecer la confiabilidad de los resultados microbiológicos, optimizar recursos económicos y técnicos de la empresa, y contribuir al cumplimiento de los estándares regulatorios exigidos por agencias nacionales e internacionales (1, 7, 14, 20).

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 Fabricación de los medios de cultivo

La fabricación de los medios de cultivo se llevó a cabo bajo condiciones controladas y siguiendo las especificaciones establecidas en las normas USP e ISO 11133, con el objetivo de garantizar su calidad y reproducibilidad en los análisis microbiológicos. El proceso se dividió en varias etapas fundamentales, desde la selección de los insumos hasta el almacenamiento del producto final. Para la preparación de los medios de cultivo, se utilizaron insumos de alta calidad, incluyendo polvos deshidratados de medios de cultivo suministrados por fabricantes certificados. Estos componentes fueron seleccionados de acuerdo con las especificaciones técnicas establecidas por la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) y la Organización Internacional de Normalización (ISO). Cada medio de cultivo fue preparado pesando la cantidad exacta de polvo deshidratado utilizando una balanza analítica calibrada. Posteriormente, el polvo fue disuelto en agua destilada o agua de calidad microbiológica adecuada, asegurando una disolución completa mediante agitación continua. En el caso de medios que requieren suplementos específicos, como antibióticos o el medio *Bukholderia* estos fueron añadidos después de la esterilización para evitar su degradación térmica. El pH de cada medio fue verificado utilizando un pH-metro calibrado antes del proceso de esterilización. Cuando fue necesario, se realizaron ajustes mediante la adición de soluciones de ácido clorhídrico (HCl) o hidróxido de sodio (NaOH) hasta alcanzar el valor requerido para cada medio de cultivo. La esterilización de los medios de cultivo se realizó mediante autoclave a una temperatura de 121°C, con una presión de 15 psi durante 15 minutos. Este proceso garantizó la eliminación de cualquier contaminación microbiana presente en los medios.

Se realizó este mismo proceso para los 3 lotes de cada tipo de medio como se puede apreciar en la siguiente tabla, el número de lote corresponde al número asignado de cada medio, para luego agregar el día y mes de fabricación, por último, el día y mes de su vencimiento vence el medio.

Tabla 1. Medios de cultivo fabricados con su número de lote, fecha de fabricación y fecha de vencimiento.

Medio de cultivo / fluido de transporte	Lote No 1	Fecha de vencimiento	Lote No 2	Fecha de vencimiento	Lote No 3	Fecha de vencimiento
AGAR TSA	03-2610-2510	25-nov-22	03-3110-3011	30-nov-22	03-0111-0112	1-dic-22
AGAR TSA + LP + Tosulfito	04-2610-2510	25-nov-22	04-3110-3011	30-nov-22	04-0111-0112	1-dic-22
AGAR SABOURAUD	05-2610-2510	25-nov-22	05-3110-3011	30-nov-22	05-0111-0112	1-dic-22
AGAR TSA + LP	06-2610-2510	25-nov-22	06-3110-3011	30-nov-22	06-0111-0112	1-dic-22
AGAR Mc CONKEY	10-2610-2510	25-nov-22	10-3110-3011	30-nov-22	10-0111-0112	1-dic-22
AGAR CETRIMIDE	11-2610-2510	25-nov-22	11-3110-3011	30-nov-22	11-0111-0112	1-dic-22
AGAR EMB	12--2610-2510	25-nov-22	12-3110-3011	30-nov-22	12--0111-0112	1-dic-22

Agar XLD	13-2610-2510	25-nov-22	13-3110-3011	30-nov-22	13-0111-0112	1-dic-22
Salado manitol	14-2610-2510	25-nov-22	14-3110-3011	30-nov-22	14-0111-0112	1-dic-22
AGAR ANTIBIOTICO 11	18-2610-2510	25-nov-22	18-3110-3011	30-nov-22	18-0111-0112	1-dic-22
AGAR ANTIBIOTICO 1	19-2610-2510	25-nov-22	19-3110-3011	30-nov-22	19-0111-0112	1-dic-22
AGAR VRBD	21-2610-2510	25-nov-22	21-3110-3011	30-nov-22	21-0111-0112	1-dic-22
AGAR CROMOGENICO	23-2610-2510	25-nov-22	23-3110-3011	30-nov-22	23-0111-0112	1-dic-22
AGAR Bukholderia cepacia	32-2610-2510	25-nov-22	32-3110-3011	30-nov-22	32-0111-0112	1-dic-22
AGAR R2A	33-2610-2510	25-nov-22	33-3110-3011	30-nov-22	33-0111-0112	1-dic-22
BUFFER PH 8,0	26-2610-2510	25-nov-22	26-0111-0112	1-dic-22	26-0911-0912	9-dic-22
PEPTONA BACTERIOLOGICA (Líquido A)	27-2610-2510	25-nov-22	27-0111-0112	1-dic-22	27-0911-0912	9-dic-22
FLUIDO D (Líquido D)	28-2610-2510	25-nov-22	28-0111-0112	1-dic-22	28-0911-0912	9-dic-22
SOLUCIÓN SALINA 0.9%	29-2610-2510	25-nov-22	29-0111-0112	1-dic-22	29-0911-0912	9-dic-22
SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATO pH 7,2	30-2610-2510	25-nov-22	30-0111-0112	1-dic-22	30-0911-0912	9-dic-22
CALDO TSB	01-2610-2510	25-nov-22	01-0210-0212	2-dic-22	01-0911-0912	9-dic-22
CALDO LACTOSA	02-2610-2510	25-nov-22	02-0211-0212	2-dic-22	02-0911-0912	9-dic-22
CALDO LETHEEN	07-2610-2510	25-nov-22	07-0210-0212	2-dic-22	07-0911-0912	9-dic-22
CALDO Mc CONKEY	09-2610-2510	25-nov-22	09-0210-0212	2-dic-22	09-0911-0912	9-dic-22
Caldo TSB (ESTERILIDAD)	15-2610-2510	25-nov-22	15-0211-0212	2-dic-22	15-0911-0912	9-dic-22
CALDO TIOGLICOLATO	16-2610-2510	25-nov-22	16-0211-0212	2-dic-22	16-0911-0912	9-dic-22
CALDO SABOURAUD	17-2610-2510	25-nov-22	17-0211-012	2-dic-22	17-0911-0912	9-dic-22
CALDO TSB + LP	34-2610-2510	25-nov-22	34-0211-0212	2-dic-22	34-0911-0912	9-dic-22

Después de la fabricación se rotularon los medios y se procedió a ser almacenados bajo condiciones controladas de acuerdo con las especificaciones establecidas en la normativa USP y la ISO 11133. Los medios sólidos preparados en placas de Petri fueron conservados en refrigeración a una temperatura de 2°C a 8°C para prevenir la deshidratación y mantener su estabilidad microbiológica. Los medios líquidos se almacenaron en recipientes herméticos a temperaturas específicas según su composición, evitando la exposición a la luz y fluctuaciones de temperatura que pudieran comprometer su rendimiento.

2.2 Promoción de crecimiento

Cepas ATCC Y NCTC

Para la reconstitución de las cepas ATCC Y NCTC se utilizaron cepas de referencia de la marca Bioball, la tabla a continuación detalla los lotes utilizados. La reconstitución de cepas de referencia es un proceso crítico en la validación y verificación de medios de cultivo, ya que garantiza la reproducibilidad de los resultados y la calidad microbiológica de los ensayos. Las cepas se almacenaron a temperaturas controladas de -20°C o -80°C hasta su uso, siguiendo las recomendaciones del fabricante y las normativas internacionales, como la ISO 11133 y la USP. Para la reconstitución de las cepas ATCC BioBall, se garantizó el uso de materiales y equipos adecuados para evitar contaminación y asegurar la viabilidad del microorganismo. Inicialmente, se retiró el vial de BioBall del almacenamiento a -20°C o -80°C y se dejó a temperatura ambiente por aproximadamente cinco minutos. Durante este tiempo, se preparó el área de trabajo dentro de la cabina de bioseguridad, desinfectando la superficie con alcohol al 70% y asegurando la disponibilidad de todo el material necesario, que incluye pipetas automáticas con sus puntas estériles, viales o tubos de ensayo estériles, asa bacteriológica.

Una vez acondicionado el entorno, se procedió a la reconstitución de la cepa. el vial se desinfectó externamente con alcohol al 70% y se abrió bajo condiciones de asepsia. En un vial estéril, se adicionó el volumen recomendado de diluyente estéril, que puede ser agua estéril, caldo de cultivo específico o solución salina, dependiendo de las indicaciones del fabricante. Se transfirió la BioBall al diluyente y se dejó reposar por unos segundos, asegurando que se disuelva completamente. Para homogeneizar la suspensión, se agitó suavemente por unos segundos.

Tabla 2. Microorganismos usados con su número de lote y su procedencia.

Microorganismo	Código	Marca	Microorganismo	Código	Marca
<i>Staphylococcus aureus</i>	NCTC 10788	BIOBALL	<i>Bacillus subtilis</i>	NCTC 10400	BIOBALL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NCTC 12924	BIOBALL	<i>Burkholderia cepacia</i>	NCTC 25416	BIOBALL
<i>Escherichia coli</i>	NCTC 12923	BIOBALL	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228	EZ-Accu shot
<i>Candida albicans</i>	NCPF 3179	BIOBALL	<i>Clostridium sporogenes</i>	NCTC 12935	BIOBALL
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	NCPF 2275	BIOBALL	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	BAA 245	BIOBALL
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 14028	EZ-Accu shot	<i>Burkholderia multivorans</i>	NCTC 13007	BIOBALL

Agares no selectivos y selectivos

Para las pruebas en los agares no selectivos y selectivos, se utilizaron los microorganismos que se detallan en la tabla a continuación. Con la ayuda de una micropipeta de 10–100 µL se tomaron 100 µL de la suspensión microbiana correspondiente, la cual se adicionó sobre la superficie de las cajas de Petri que contenían los medios de cultivo preparados. En el caso de los medios de superficie, el inóculo se distribuyó uniformemente hasta su completa absorción, mientras que en los medios de fundición se incorporó el inóculo antes de verter el medio fundido para asegurar una distribución homogénea. Para los medios selectivos se emplearon suspensiones con una concentración aproximada de 10⁵ UFC/mL de los microorganismos que se buscaba inhibir, con el fin de evaluar la eficacia inhibitoria del medio. Los ensayos se realizaron por duplicado para cada microorganismo, y los microorganismos empleados, así como las condiciones de incubación, variaron según el tipo de agar, siguiendo los rangos de temperatura y tiempo establecidos en las Farmacopeas de los Estados Unidos (USP) y la norma ISO 11133, que determinan los parámetros específicos para cada microorganismo, como se puede observar en la siguiente tabla.

Tabla 3. Microorganismos inoculados en cada medio de cultivo y sus condiciones de incubación.

Código	Medios de cultivo	Microorganismo inoculado	Condiciones de incubación
1	CALDO TSB	<i>S. aureus</i>	30°C – 35°C x ≤ 72 h
		<i>P. aeruginosa</i>	
		<i>B. spizizenii</i>	
		Control (-)	
2	CALDO LACTOSA	<i>E.coli</i>	30°C – 35°C x ≤ 72 h
		<i>Salmonella spp.</i>	
		Control (-)	
3	AGAR TSA	<i>S. aureus</i>	30°C – 35°C x ≤ 72 h
		<i>P. aeruginosa</i>	
		<i>B. spizizenii</i>	
		<i>C. albicans</i>	20°C – 25°C x ≤ 5 días
		<i>A.brasiliensis</i>	
		Control (-)	
4	AGAR TSA + L/P + Tiosulfato	<i>S. aureus</i>	30°C – 35°C x ≤ 72 h
		<i>P. aeruginosa</i>	
		<i>B. spizizenii</i>	
		<i>M.luteus</i>	20°C – 25°C x ≤ 5 días
		<i>C. albicans</i>	

		<i>A. brasiliensis</i>	
		Control (-)	30°C – 35°C x ≤ 5 días
5	AGAR SABOURAUD	<i>C. albicans</i>	20°C – 25°C x ≤ 5 días
		<i>A. brasiliensis</i>	
		Control (-)	20°C – 25°C x ≤ 7 días
6	AGAR TSA + L/P	<i>S. aureus</i>	
		<i>P. aeruginosa</i>	30°C – 35°C x ≤ 72 h
		<i>B. spizizenii</i>	
		<i>C. albicans</i>	
		<i>A. brasiliensis</i>	30°C – 35°C x ≤ 5 días
		Control (-)	
7	CALDO LETHEEN	<i>S. aureus</i>	
		<i>P. aeruginosa</i>	30°C – 35°C x ≤ 72 h
		<i>B. spizizenii</i>	
		Control (-)	
		M.I: <i>S. aureus</i>	30°C – 35°C x 24 h
		Control (-)	
9	CALDO MacCONKEY	<i>E. coli</i>	42°C – 44°C x 24 h
		M.I: <i>S. aureus</i>	42°C – 44°C x 48 h
		Control (-)	
10	AGAR Mc CONKEY	<i>E. coli</i>	30°C – 35°C x 18 h
		M.I: <i>S. aureus</i>	30°C – 35°C x 72 h
		Control (-)	
11	AGAR CETRIMIDE	<i>P. aeruginosa</i>	30°C – 35°C x 18 h
		M.I: <i>E. coli</i>	30°C – 35°C x 72 h
		Control (-)	
12	AGAR EMB	<i>E. coli</i>	30°C – 35°C x 24 h
		M.I: <i>S. aureus</i>	30°C – 35°C x 72 h
		Control (-)	

		Control (-)	30°C – 35°C x 48 h
14	AGAR SALADO MANITOL	<i>S. aureus</i>	30°C – 35°C x 18 h
		M.I: <i>E. coli</i>	30°C – 35°C x 72 h
		Control (-)	
15	TSB (ESTERILIDAD)	<i>B. spizizenii</i>	20°C – 25°C x ≤72 h
		<i>A. brasiliensis</i>	20°C – 25°C x ≤ 5 días
		<i>C. albicans</i>	
		Control (-)	20°C – 25°C x ≤14 días
16	CALDO TIOGLICOLATO	<i>S. aureus</i>	30°C – 35°C x ≤ 3 días
		<i>P. aeruginosa</i>	
		<i>C. sporogenes</i>	
		Control (-)	30°C – 35°C x 14 Días
17	CALDO SABOURAUD	<i>C. albicans</i>	30°C – 35°C x 72 h
		Control (-)	20°C – 25°C x 5 días
18	AGAR ANTIBIOTICO 11	<i>S. epidermidis</i>	30°C – 35°C x 24 h
		Control (-)	30°C – 35°C x 72 h
19	AGAR ANTIBIOTICO 1	<i>B. subtilis</i>	30°C – 35°C x 24 h
		Control (-)	30°C – 35°C x 72 h
		M.I: <i>P. aeruginosa</i>	30°C – 35°C x 48 h
		M.I: <i>S. aureus</i>	
		Control (-)	
21	AGAR VRBD	<i>E. coli</i>	30°C – 35°C x 18 h
		<i>P. aeruginosa</i>	
		Control (-)	30°C – 35°C x 24 h
23	AGAR CROMOGENICO	<i>E. coli</i>	30°C – 35°C x 18 h
		<i>P. aeruginosa</i>	
		Control (-)	30°C – 35°C x 24 h
		Control (-)	35°C – 37°C x 72 h (Anaerobiosis)
25	SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE CLORURO DE SODIO PEPTONA pH 7,0	<i>S. aureus</i>	30°C – 35°C x 72 h
		<i>P. aeruginosa</i>	
		<i>B. spizizenii</i>	

		<i>A. brasiliensis</i>	20°C – 25°C x 5 días
		<i>C. albicans</i>	
		Control (-)	30°C – 35°C x 5 días
		<i>S. aureus</i>	
		<i>P. aeruginosa</i>	30°C – 35°C x 72 h
		<i>B. spizizenii</i>	
26	BUFFER pH 8,0	<i>A. brasiliensis</i>	20°C – 25°C x 5 días
		<i>C. albicans</i>	
		Control (-)	30°C – 35°C x 5 días
		<i>S. aureus</i>	
		<i>P. aeruginosa</i>	30°C – 35°C x 72 h
		<i>B. spizizenii</i>	
27	PEPTONA BACTERIOLOGICA (Líquido A)	<i>A. brasiliensis</i>	20°C – 25°C x 5 días
		<i>C. albicans</i>	
		Control (-)	30°C – 35°C x 5 días
		<i>S. aureus</i>	
		<i>P. aeruginosa</i>	30°C – 35°C x 72 h
		<i>B. spizizenii</i>	
28	FLUIDO D (Líquido D)	<i>A. brasiliensis</i>	20°C – 25°C x 5 días
		<i>C. albicans</i>	
		Control (-)	30°C – 35°C x 5 días
		<i>S. aureus</i>	
		<i>P. aeruginosa</i>	30°C – 35°C x 72 h
		<i>B. spizizenii</i>	
29	SOLUCIÓN SALINA 0.9%	<i>A. brasiliensis</i>	20°C – 25°C x 5 días
		<i>C. albicans</i>	
		Control (-)	30°C – 35°C x 5 días
30		<i>S. aureus</i>	

	SOLUCIÓN AMORTIGUADORA MADRE	<i>P. aeruginosa</i>	30°C – 35°C x 72 h
		<i>B. spizizenii</i>	
		<i>A. brasiliensis</i>	20°C – 25°C x 5 días
		<i>C. albicans</i>	
		Control (-)	30°C – 35°C x 5 días
31	SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATO pH 7,2	<i>S. aureus</i>	
		<i>P. aeruginosa</i>	30°C – 35°C x 72 h
		<i>B. spizizenii</i>	
		<i>A. brasiliensis</i>	20°C – 25°C x 5 días
		<i>C. albicans</i>	
	Control (-)	30°C – 35°C x 5 días	
32	<i>Burkholderia cepacia</i> AGAR SELECTIVO	<i>B. cepacia</i>	30°C – 35°C x 48 h
		<i>B. cenocepacia</i> ó <i>B. multivorans</i>	
		M.I: <i>P. aeruginosa</i>	30°C – 35°C x 72 h
		M.I: <i>S. aureus</i>	
		Control (-)	
33	AGAR R2A	<i>B. subtilis</i>	
		<i>P. aeruginosa</i>	30°C – 35°C x 48 h
		<i>S. aureus</i>	
		<i>E. coli</i>	
			<i>A. brasiliensis</i>
	<i>C. albicans</i>		
	Control (-)	30°C – 35°C x 5 Días	
34	CALDO TSB + L/P	<i>S. aureus</i>	30°C – 35°C x 72 h
		<i>P. aeruginosa</i>	
		<i>B. spizizenii</i>	
		Control (-)	30°C – 35°C x 5 días
35	AGAR SABOURAUD	<i>A. brasiliensis</i>	20°C – 25°C x 5 días
		<i>C. albicans</i>	

Control (-)	30°C – 35°C x 7 días
Microorganismo nativo	

Tras la incubación, se realizó el conteo de las colonias en cada medio y se compararon con los valores obtenidos en los medios de control. Para el día 1 se utilizaron medios fabricados para rutina, y para los días 14 y 30 se tomó como referencia el desempeño del día 1, con el fin de calcular el porcentaje de recuperación, el cual se considera aceptable entre 50 % y 200 %. El cálculo se efectuó tomando el promedio de los duplicados tanto de los medios a evaluar como de los medios de referencia, aplicando la siguiente fórmula:

$$\%R = \left(\frac{\text{Promedio UFC del medio a evaluar}}{\text{Promedio UFC del medio de referencia}} \right) * 100$$

Caldos selectivos y no selectivos

Para los caldos selectivos y no selectivos, con ayuda de una micropipeta de 10–100 µL se tomaron 100 µL de la suspensión microbiana correspondiente, los cuales se adicionaron a los tubos que contenían los diferentes caldos preparados, según el tipo de medio evaluado. Los ensayos se realizaron por duplicado para cada microorganismo. Posteriormente, los caldos se incubaron de acuerdo con las condiciones de temperatura y tiempo establecidas en las Farmacopeas de los Estados Unidos (USP) y en la norma ISO 11133, las cuales definen los rangos específicos de incubación según el tipo de medio y microorganismo empleado. Se incluyó un control negativo para verificar la esterilidad de los medios.

Después del periodo de incubación, se observó la presencia o ausencia de turbidez en los caldos, expresando el nivel de crecimiento microbiano mediante una escala semicuantitativa: sin crecimiento (0), poco crecimiento (1) y buen crecimiento (2). Los resultados obtenidos en los días 14 y 30 se compararon con los valores de referencia del día 1 de fabricación, correspondiente a los medios utilizados en rutina, con el fin de determinar la variación en el desempeño y la capacidad de promoción de crecimiento a lo largo del tiempo de almacenamiento.

Fluidos de transporte

Para los fluidos de transporte, se utilizaron cepas microbianas de referencia para evaluar el desempeño de los fluidos de transporte. Las suspensiones iniciales se ajustaron a una concentración aproximada de 10⁸ UFC/mL, a partir de la cual se realizaron diluciones seriadas utilizando como diluyente la misma solución de transporte en evaluación, hasta obtener una concentración final de 10⁴ UFC/mL. De esta última suspensión se tomaron 100 µL y se inocularon sobre agar TSA + LP + TIO, distribuyendo el inóculo uniformemente con ayuda de un asa estéril. Esta primera inoculación se consideró como tiempo 0. Transcurridos 45 minutos, se repitió el mismo procedimiento utilizando la misma dilución para generar el tiempo 2.

Los medios se incubaron en las condiciones de temperatura y tiempo establecidas para cada microorganismo, siguiendo los parámetros definidos por la Farmacopea de los Estados Unidos (USP <1117>) y la norma ISO 11133, que determinan los rangos específicos para ensayos de viabilidad microbiana. Una vez completado el periodo de incubación, se realizó el conteo de colonias correspondientes a los tiempos 0 y 45 min, calculando el promedio de los duplicados. Con estos valores se determinó el porcentaje de recuperación (% R) mediante la siguiente ecuación:

$$\%Recuperacion = \left(\frac{T1 * 100}{T2} \right) - 100$$

El criterio de aceptación establece que la variación en la recuperación microbiana entre ambos tiempos no debe superar el $\pm 30\%$. Es decir, los microorganismos dentro del fluido de transporte no deben mostrar un crecimiento ni una disminución superior al 30% respecto al tiempo 0. Cumplir este criterio confirma la eficacia del fluido de transporte para preservar la viabilidad microbiana durante el tiempo evaluado.

2.3 Identificación de microorganismos y controles

Al finalizar la incubación de las placas y caldos, se realizó una verificación morfológica y macroscópica de las colonias obtenidas, comparando las características observadas (forma, color, textura y aspecto) con las descritas en la documentación técnica de cada microorganismo. Este análisis permitió confirmar que las colonias desarrolladas correspondían a las especies inoculadas en cada medio de cultivo. Los medios selectivos facilitaron esta verificación, ya que los microorganismos presentan características diferenciales derivadas de su metabolismo, como cambios en la coloración del medio o la formación de colonias con pigmentos específicos, lo que permitió contrastar su identidad de manera efectiva.

Por cada medio evaluado se mantuvo un duplicado sin inocular, el cual no fue sometido al ensayo de promoción de crecimiento y acompañó a los medios inoculados durante todo el proceso de incubación, sirviendo como control negativo para verificar la esterilidad de los medios. Adicionalmente, se inocularon $100\ \mu\text{L}$ de suspensiones con concentraciones menores a 100 UFC de las cepas empleadas, sobre agar TSA suplementado con lecitina y polisorbato, a fin de verificar la recuperación de los microorganismos y descartar efectos residuales de agentes neutralizantes. Las placas se incubaron bajo las condiciones de temperatura y tiempo establecidas por la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) y la norma ISO 11133, de acuerdo con los requerimientos específicos de cada microorganismo.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Previo al análisis de los resultados cuantitativos de promoción de crecimiento, se consolidó la información correspondiente a los medios de cultivo utilizados, los microorganismos inoculados y las condiciones de incubación aplicadas durante el estudio. La tabla a continuación presenta la relación entre cada tipo de medio de cultivo y el microorganismo empleado, junto con las condiciones de incubación (temperatura y tiempo) establecidas conforme a los rangos recomendados por las Farmacopeas de los Estados Unidos (USP), así como las características morfológicas observadas tras la incubación. De igual manera, se realizó la caracterización morfológica de cada microorganismo incubado. Esta información sirvió como referencia para la verificación de la pureza, el crecimiento y la identificación microbiológica de las cepas en los diferentes medios evaluados.

Tabla 4. Características morfológicas de los microorganismos incubados en cada medio de cultivo de acuerdo con las condiciones establecidas de incubación.

Medios de cultivo	Microorganismo inoculado	Condiciones de incubación	Características morfológicas de las colonias
-------------------	--------------------------	---------------------------	--

CALDO TSB	<i>S. aureus</i>	30°C – 35°C x ≤ 72 h	Crecimiento positivo, turbio
	<i>P. aeruginosa</i>		
	<i>B. spizizenii</i>		
	Control (-)		
CALDO LACTOSA	<i>E.coli</i>	30°C – 35°C x ≤ 72 h	Crecimiento positivo, turbio
	<i>Salmonella spp.</i>		
	Control (-)		
	Control (-)		
AGAR TSA	<i>S. aureus</i>	30°C – 35°C x ≤ 72 h	Colonia amarilla, bordes Regulares
	<i>P. aeruginosa</i>		Colonia plana, borde irregular, cremosa. El medio torna a verde
	<i>B. spizizenii</i>		Colonia plana, grande, bordes irregulares
	<i>C. albicans</i>	20°C – 25°C x ≤ 5 días	Colonia blanca, grande, cremosa y elevada
	<i>A.brasiliensis</i>		Colonia negra-verdosa, mohosa y esporulada
	Control (-)	30°C – 35°C x ≤ 5 días	Crecimiento Negativo - Transparente
	AGAR TSA + L/P + Tiosulfato	<i>S. aureus</i>	30°C – 35°C x ≤ 72 h
<i>P. aeruginosa</i>		Colonia plana, borde irregular, cremosa. El medio torna a verde	
<i>B. spizizenii</i>		Colonia plana, grande, bordes irregulares	
<i>M.luteus</i>		20°C – 25°C x ≤ 5 días	Colonia amarilla, grande y cremosa
<i>C. albicans</i>			Colonia blanca, grande, cremosa y elevada
<i>A.brasiliensis</i>			Colonia negra-verdosa, mohosa y esporulada
Control (-)		30°C – 35°C x ≤ 5 días	Crecimiento Negativo - Transparente
AGAR SABOURAUD	<i>C. albicans</i>	20°C – 25°C x ≤ 5 días	Colonia blanca, grande, cremosa y elevada
	<i>A.brasiliensis</i>		Colonia negra-verdosa, mohosa y esporulada
	Control (-)	20°C – 25°C x ≤ 7 días	Crecimiento Negativo - Transparente
	AGAR TSA + L/P	<i>S. aureus</i>	30°C – 35°C x ≤ 72 h
<i>P. aeruginosa</i>		Colonia plana, borde irregular, cremosa. El medio torna a verde	
<i>B. spizizenii</i>		Colonia Plana, Grande, Bordes Irregulares	
<i>C. albicans</i>		30°C – 35°C x ≤ 5 días	Colonia blanca, grande, cremosa y elevada
<i>A.brasiliensis</i>			Colonia negra-verdosa, mohosa y esporulada
Control (-)			Crecimiento Negativo - Transparente

CALDO LETHEEN	<i>S. aureus</i>	30°C – 35°C x ≤ 72 h	Crecimiento positivo, turbio
	<i>P. aeruginosa</i>		
	<i>B. spizizenii</i>		
	Control (-)		
	M.I: <i>S. aureus</i>		
	Control (-)	30°C – 35°C x 24 h	Crecimiento negativo, transparente
CALDO MacCONKEY	<i>E.coli</i>	42°C – 44°C x 24 h	Medio turbio. Cambio de color a azul claro
	M.I: <i>S. aureus</i>	42°C – 44°C x 48 h	Crecimiento negativo, transparente
	Control (-)		
AGAR Mc CONKEY	<i>E.coli</i>	30°C – 35°C x 18 h	Colonia rosada, plana, seca, bordes irregulares, halo alrededor de la colonia
	M.I: <i>S. aureus</i>	30°C – 35°C x 72 h	Crecimiento Negativo, transparente
	Control (-)		
AGAR CETRIMIDE	<i>P. aeruginosa</i>	30°C – 35°C x 18 h	Colonia plana, borde irregular, cremosa, medio Verde
	M.I: <i>E.coli</i>	30°C – 35°C x 72 h	Crecimiento negativo, transparente
	Control (-)		
AGAR EMB	<i>E.coli</i>	30°C – 35°C x 24 h	Colonia verde metálica, plana
	M.I: <i>S.aureus</i>	30°C – 35°C x 72 h	Crecimiento negativo, transparente
	Control (-)	30°C – 35°C x 48 h	Crecimiento negativo, transparente
	Control (-)		
AGAR SALADO MANITOL	<i>S. aureus</i>	30°C – 35°C x 18 h	Colonia amarilla, elevada, borde regular. Viraje del medio a amarillo
	M.I: <i>E. coli</i>	30°C – 35°C x 72 h	Crecimiento negativo, transparente
	Control (-)		
TSB (ESTERILIDAD)	<i>B. spizizenii</i>	20°C – 25°C x ≤72 h	Crecimiento positivo, turbio
	<i>A.brasiliensis</i>	20°C – 25°C x ≤ 5 días	
	<i>C.albicans</i>	20°C – 25°C x ≤14 días	
	Control (-)		Crecimiento negativo, transparente
CALDO TIOGLICOLATO	<i>S. aureus</i>	30°C – 35°C x ≤ 3 días	Crecimiento positivo, turbio
	<i>P. aeruginosa</i>		
	<i>C. sporogenes</i>		
	Control (-)		
CALDO SABOURAUD	<i>C. albicans</i>	30°C – 35°C x 72 h	Crecimiento positivo, turbio
	Control (-)	20°C – 25°C x 5 días	Crecimiento negativo, transparente
AGAR ANTIBIOTICO 11	<i>S. epidermidis</i>	30°C – 35°C x 24 h	Colonia blanca, bordes regulares

AGAR ANTIBIOTICO 1	Control (-)	30°C – 35°C x 72 h	Crecimiento negativo, transparente
	<i>B. subtilis</i>	30°C – 35°C x 24 h	Colonia plana, grande, bordes irregulares
	Control (-)	30°C – 35°C x 72 h	Crecimiento negativo, transparente
	M.I: <i>P. aeruginosa</i>		
	M.I: <i>S. aureus</i>	30°C – 35°C x 48 h	Crecimiento negativo, transparente
AGAR VRBD	Control (-)		
	<i>E. coli</i>	30°C – 35°C x 18 h	Colonia Pequeña, verde metálica
	<i>P. aeruginosa</i>	30°C – 35°C x 24 h	Colonia plana, borde irregular
AGAR CROMOGENICO	Control (-)		
	<i>E. coli</i>	30°C – 35°C x 18 h	Colonia cremosa, color morado-azul
	<i>P.aeruginosa</i>	30°C – 35°C x 24 h	Colonia transparente sin pigmentación
	Control (-)	35°C – 37°C x 72 h (Anaerobiosis)	Crecimiento negativo, transparente
SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE CLORURO DE SODIO PEPTONA pH 7,0	Control (-)		
	<i>S. aureus</i>	30°C – 35°C x 72 h	Colonia amarilla, bordes regulares
	<i>P. aeruginosa</i>	30°C – 35°C x 72 h	Colonia plana, borde irregular, cremosa. El medio torna a verde
	<i>B. spizizenii</i>	20°C – 25°C x 5 días	Colonia plana, grande, bordes irregulares
	<i>A.brasiliensis</i>	20°C – 25°C x 5 días	Colonia negra-verdosa, mohosa y esporulada
	<i>C.albicans</i>	30°C – 35°C x 5 días	Colonia blanca, grande, cremosa y elevada
BUFFER pH 8,0	Control (-)		
	<i>S. aureus</i>	30°C – 35°C x 72 h	Colonia amarilla, bordes regulares
	<i>P. aeruginosa</i>	30°C – 35°C x 72 h	Colonia plana, borde irregular, cremosa. El medio torna a verde
	<i>B. spizizenii</i>	20°C – 25°C x 5 días	Colonia plana, grande, bordes irregulares
	<i>A.brasiliensis</i>	20°C – 25°C x 5 días	Colonia negra-verdosa, mohosa y esporulada
	<i>C.albicans</i>	30°C – 35°C x 5 días	Colonia blanca, grande, cremosa y elevada
PEPTONA BACTERIOLOGICA (Líquido A)	Control (-)		
	<i>S. aureus</i>	30°C – 35°C x 72 h	Colonia amarilla, bordes regulares
	<i>P. aeruginosa</i>	30°C – 35°C x 72 h	Colonia plana, borde irregular, cremosa. El medio torna a verde
	<i>B. spizizenii</i>	20°C – 25°C x 5 días	Colonia plana, grande, bordes irregulares
	<i>A.brasiliensis</i>	20°C – 25°C x 5 días	Colonia negra-verdosa, mohosa y esporulada
	<i>C.albicans</i>	20°C – 25°C x 5 días	Colonia blanca, grande, cremosa y elevada

FLUIDO D (Líquido D)	Control (-)	30°C – 35°C x 5 días	Crecimiento negativo, transparente
	<i>S. aureus</i>		Colonia amarilla, bordes regulares
	<i>P. aeruginosa</i>	30°C – 35°C x 72 h	Colonia plana, borde irregular, cremosa. El medio torna a verde
	<i>B. spizizenii</i>		Colonia plana, grande, bordes irregulares
	<i>A. brasiliensis</i>	20°C – 25°C x 5 días	Colonia negra-verdosa, mohosa y esporulada
	<i>C. albicans</i>		Colonia blanca, grande, cremosa y elevada
SOLUCIÓN SALINA 0.9%	Control (-)	30°C – 35°C x 5 días	Crecimiento negativo, transparente
	<i>S. aureus</i>		Colonia amarilla, bordes regulares
	<i>P. aeruginosa</i>	30°C – 35°C x 72 h	Colonia plana, borde irregular, cremosa. El medio torna a verde
	<i>B. spizizenii</i>		Colonia plana, grande, bordes irregulares
	<i>A. brasiliensis</i>	20°C – 25°C x 5 días	Colonia negra-verdosa, mohosa y esporulada
	<i>C. albicans</i>		Colonia blanca, grande, cremosa y elevada
SOLUCIÓN AMORTIGUADORA MADRE	Control (-)	30°C – 35°C x 5 días	Crecimiento negativo, transparente
	<i>S. aureus</i>		Colonia amarilla, bordes regulares
	<i>P. aeruginosa</i>	30°C – 35°C x 72 h	Colonia plana, borde irregular, cremosa. El medio torna a verde
	<i>B. spizizenii</i>		Colonia plana, grande, bordes irregulares
	<i>A. brasiliensis</i>	20°C – 25°C x 5 días	Colonia negra-verdosa, mohosa y esporulada
	<i>C. albicans</i>		Colonia blanca, grande, cremosa y elevada
SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATO pH 7,2	Control (-)	30°C – 35°C x 5 días	Crecimiento negativo, transparente
	<i>S. aureus</i>		Colonia amarilla, bordes regulares
	<i>P. aeruginosa</i>	30°C – 35°C x 72 h	Colonia plana, borde irregular, cremosa. El medio torna a verde
	<i>B. spizizenii</i>		Colonia plana, grande, bordes irregulares
	<i>A. brasiliensis</i>	20°C – 25°C x 5 días	Colonia negra-verdosa, mohosa y esporulada
	<i>C. albicans</i>		Colonia blanca, grande, cremosa y elevada
<i>Bukholderia cepacia</i> AGAR SELECTIVO	Control (-)	30°C – 35°C x 5 días	Crecimiento negativo, transparente
	<i>B. cepacia</i>	30°C – 35°C x 48 h	Colonia marrón-verdoso, halo amarillo, colonia rodeada por una zona rojo-rosa
	<i>B. cenocepacia</i> ó <i>B. multivorans</i>		Colonia gris
	M.I: <i>P. aeruginosa</i>		Colonia blanca-gris
			Crecimiento negativo, transparente

	M.I: <i>S. aureus</i>	30°C – 35°C x 72 h	
	Control (-)		
AGAR R2A	<i>B. subtilis</i>		Colonia plana, grande, bordes irregulares
	<i>P. aeruginosa</i>	30°C – 35°C x 48 h	Colonia plana, borde irregular, cremosa. El medio torna a verde
	<i>S.aureus</i>		Colonia amarilla, bordes regulares
	<i>E. coli</i>		Colonia amarilla, bordes regulares
	<i>A.brasiliensis</i>		Colonia negra-verdosa, mohosa y esporulada
	<i>C. albicans</i>	20°C – 25°C x 5 días	Colonia blanca, grande, cremosa y elevada
	Control (-)	30°C – 35°C x 5 Días	Crecimiento negativo, transparente
CALDO TSB + L/P	<i>S. aureus</i>		
	<i>P. aeruginosa</i>	30°C – 35°C x 72 h	Crecimiento positivo, turbio
	<i>B. spizizenii</i>		
	Control (-)	30°C – 35°C x 5 días	Crecimiento negativo, transparente
AGAR SABOURAUD	<i>A.brasiliensis</i>	20°C – 25°C x 5 días	Colonia negra-verdosa, mohosa y esporulada
	<i>C.albicans</i>		Colonia blanca, grande, cremosa y elevada
	Control (-)	30°C – 35°C x 7 días	Crecimiento negativo, transparente
Microorganismo nativo			

3.1 Características fisicoquímicas

Después de la preparación de los diferentes lotes de medios sólidos y líquidos, se evaluaron sus características físicas (color, textura y apariencia) en los días 1, 15 y 30 posteriores a la fabricación. En todos los casos, los medios conservaron su aspecto característico de acuerdo con lo descrito en la literatura; sin evidenciar la presencia de precipitados, grietas, deshidratación, turbidez no deseada ni cambios de color. Los medios sólidos mantuvieron una consistencia firme, homogénea, con coloración estable y superficie lisa, lo cual corresponde con lo establecido en manuales técnicos y en normas internacionales como la ISO 11133:2014, que señalan que los parámetros organolépticos deben mantenerse inalterados para asegurar la calidad de los medios antes de su uso en ensayos microbiológicos (7, 20, 21).

La estabilidad de estos parámetros macroscópicos respalda la confiabilidad del desempeño microbiológico, pues alteraciones visibles en la textura o el color del agar suelen asociarse con degradación de los nutrientes, inadecuada esterilización o pérdida de humedad, factores que comprometen el crecimiento microbiano esperado (13, 14). Estos resultados coinciden con lo reportado por otros autores, quienes señalan que los medios preparados en condiciones controladas de esterilidad y almacenamiento pueden mantener su estabilidad física hasta por 30 días sin afectar su funcionalidad (9, 11, 14). De igual manera, los medios líquidos y fluidos de transporte (TSB, TSA + LP, Caldo Lactosado, Caldo Tioglicolato, Caldo Sabouraud, Buffer fosfato pH 7.2, solución salina 0.9 %, Fluido D, entre otros) conservaron una apariencia transparente, sin formación de turbidez, partículas en suspensión ni precipitados. Este hallazgo sugiere un adecuado control en la preparación y almacenamiento, garantizando que la composición química se mantuvo estable durante el periodo de evaluación. La ausencia de turbidez no asociada al crecimiento microbiano es un criterio fundamental, ya que asegura que el medio conserva su esterilidad y que los resultados de las pruebas no se verán interferidos por contaminaciones o descomposición de componentes (1, 5, 10).

En cuanto al pH, la medición realizada en los fluidos de transporte (Buffer pH 8.0, Fluido D, Solución salina 0.9 %, Líquido A y Solución fosfato pH 7.2) y en los caldos (TSB, Caldo Lactosa, Caldo Lethen, Caldo McConkey, TSB para esterilidad, Caldo Tioglicolato, Caldo Sabouraud y caldo TSB + LP) mostró valores estables durante los días 1, 15 y 30, posteriores a la preparación como se puede ver en la tabla a continuación. En la mayoría de los casos, las variaciones fueron menores a 0,2 unidades de pH, lo cual se encuentra dentro de los criterios de aceptación descritos en la ISO 11133:2014 y en los capítulos <61> y <62> de la United States Pharmacopeia (USP), que consideran inaceptable una desviación mayor a $\pm 0,5$ unidades (7, 20, 21).

Tabla 5. Datos de los pH de las soluciones de transporte y caldos durante el estudio.

Medio / Fluido	pH esperado	Día 1	Día 15	Día 30
Buffer pH 8.0	8.0 \pm 0.2	8	8	7.9
Fluido D	7.1 – 7.3	7.2	7.2	7.1
Solución salina 0.9 %	7.0 \pm 0.2	7	7	6.9
Líquido A (Peptona bacteriol)	7.2 \pm 0.2	7.2	7.1	7.1
Solución fosfato pH 7.2	7.2 \pm 0.2	7.2	7.2	7.1
TSB	7.3 \pm 0.2	7.3	7.2	7.1
Caldo Lactosa	6.8 – 7.0	6.9	6.9	6.8
Caldo Lethen	7.1 \pm 0.2	7.1	7	7
Caldo McConkey	7.2 \pm 0.2	7.2	7.1	7.1
TSB (esterilidad)	7.3 \pm 0.2	7.3	7.2	7.2
Caldo Tioglicolato	7.1 \pm 0.2	7.1	7	7
Caldo Sabouraud	5.6 \pm 0.2	5.6	5.6	5.5
TSB + LP	7.2 – 7.3	7.2	7.2	7.1

Estos resultados confirman que tanto los fluidos de transporte como los caldos conservaron su estabilidad fisicoquímica bajo las condiciones de almacenamiento establecidas, asegurando que sus propiedades intrínsecas no se vieran comprometidas durante el periodo de 30 días evaluado. La estabilidad del pH es un indicador crítico, ya que desviaciones significativas afectan directamente la disponibilidad de nutrientes y la viabilidad de los microorganismos de referencia, comprometiendo así la productividad de los medios (, 14, 17). En este sentido, la literatura ha señalado que mantener el pH dentro de un rango estrecho es esencial para garantizar la confiabilidad de pruebas de promoción de crecimiento y recuperación microbiana.

En conjunto, los resultados obtenidos evidencian que los medios de cultivo preparados en el laboratorio de control de calidad microbiológica de la empresa farmacéutica mantuvieron su estabilidad física y química en el periodo evaluado. Esto respalda su uso confiable durante 30 días, en concordancia con los lineamientos normativos y con lo descrito por estudios previos en entornos farmacéuticos y académicos (7, 11, 14, 20).

3.2 Promoción de crecimiento caldos

Los valores de turbidez registrados en los ensayos de promoción de crecimiento realizados con los caldos no selectivos y selectivos durante los días 1, 15 y 30 de evaluación, se detallan en la tabla a continuación. Este

parámetro permitió determinar de forma cualitativa la capacidad de los caldos para favorecer el desarrollo microbiano, considerando la intensidad de crecimiento observada como un indicador indirecto de la viabilidad y estabilidad del medio a lo largo del tiempo de almacenamiento.

Tabla 6. Valores de turbidez de los microorganismos en la promoción de crecimiento de los caldos

Caldo	Microorganismo inoculado	Día 1	Día 15	Día 30	Cumplimiento
Caldo TSB	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Bacillus spizizenii</i>	2	2	2	Aprobado
Caldo Lactosa	<i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella spp.</i>	2	2	2	Aprobado
Caldo Lethéen	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Bacillus spizizenii</i>	2	2	2	Aprobado
Caldo McConkey	<i>Escherichia coli</i>	2	2	2	Aprobado
TSB (esterilidad)	<i>Bacillus spizizenii</i> , <i>Aspergillus brasiliensis</i> , <i>Candida albicans</i>	2	2	2	Aprobado
Caldo Tioglicolato	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Clostridium sporogenes</i>	2	2	2	Aprobado
Caldo Sabouraud	<i>Candida albicans</i> , <i>Aspergillus brasiliensis</i>	2	2	2	Aprobado
TSB + LP	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Bacillus spizizenii</i>	2	2	2	Aprobado

Caldo Tryptic Soy Broth (TSB). El TSB, formulado con peptonas de caseína y soja, glucosa, NaCl y K_2HPO_4 , constituye un medio nutritivo versátil ampliamente utilizado en la industria farmacéutica (31, 36). En este estudio, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* presentaron turbidez intensa y homogénea en los días 1, 15 y 30, confirmando la riqueza nutricional del medio para bacterias aerobias y facultativas (33, 34). En el caso de *Bacillus spizizenii*, el crecimiento se expresó como turbidez suave con formación de una película superficial, lo cual coincide con la capacidad de especies del grupo *Bacillus subtilis* para producir biopelículas en la interfase aire-líquido en medios ricos, donde el oxígeno favorece la agregación celular (41, 46). Este comportamiento diferencial evidencia tanto la productividad del TSB como la influencia de la fisiología microbiana en la expresión macroscópica del crecimiento.

Caldo Lactosa. Este medio, compuesto por peptona, extracto de carne y lactosa, es utilizado para favorecer el crecimiento de enterobacterias y evaluar su capacidad fermentativa (44). Los resultados fueron consistentes con los fenotipos esperados: *Escherichia coli* generó turbidez intensa y acidificación del medio, asociada a fermentación activa de lactosa con producción de gas, mientras que *Salmonella spp.* presentó turbidez homogénea sin fermentación, lo cual refleja su carácter de no fermentador de lactosa (43). Estos hallazgos demuestran que el medio conservó su capacidad diferenciadora y de promoción de crecimiento durante los 30 días, en concordancia con lo establecido en la USP <62> y la ISO 11133 (7, 21).

Caldo Lethéen. El Lethéen broth contiene peptonas y extracto de levadura, suplementados con lecitina y polisorbato 80 como neutralizantes de compuestos antimicrobianos residuales (9, 20). En este estudio, *S. aureus* y *P. aeruginosa* mostraron turbidez intensa y homogénea en todos los tiempos evaluados, mientras que *B. spizizenii* formó una película superficial, consistente con su capacidad biofilmogénica (41, 47). Estos resultados confirman la eficacia del Lethéen como medio nutritivo y su relevancia en procesos de control de calidad farmacéutico, donde se emplea para validar la neutralización de desinfectantes (7, 19).

Caldo McConkey. Formulado con peptonas, lactosa, sales biliares y cristal violeta, este medio selectivo favorece el crecimiento de bacterias gramnegativas e inhibe grampositivas (43). En el presente estudio, *E. coli* mostró

turbidez intensa y acidificación del medio en los tres tiempos, evidenciando su rápida fermentación de lactosa. Asimismo, la prueba de inhibición con *S. aureus* (10^5 UFC/mL) confirmó la eficacia del medio, ya que no se observó crecimiento, demostrando que sus agentes selectivos conservaron su actividad inhibitoria a lo largo de los 30 días. Este resultado respalda lo descrito en la literatura, donde el McConkey es considerado uno de los medios diferenciales más robustos para enterobacterias (43, 44).

Caldo Tioglicolato. Este medio combina peptonas, extracto de levadura, glucosa, cistina y tioglicolato de sodio, generando condiciones reductoras que permiten el crecimiento tanto de microorganismos aerobios como anaerobios (20, 21). En este trabajo, *S. aureus* y *P. aeruginosa* mostraron turbidez en la superficie, consistente con su metabolismo aeróbico, mientras que *Clostridium sporogenes* produjo turbidez intensa en el fondo, evidenciando su carácter estrictamente anaerobio. La diferenciación espacial del crecimiento se mantuvo en los tres tiempos evaluados, lo cual confirma que el gradiente de oxígeno del medio permaneció estable y funcional, en concordancia con los criterios de la USP <62> y la ISO 11133 (7, 21).

Caldo Sabouraud. Formulado con peptona y alta concentración de glucosa a pH ácido (~5.6), es un medio especializado para hongos y levaduras (44). En este ensayo, *Candida albicans* desarrolló turbidez progresiva con sedimento blanco al fondo, mientras que *Aspergillus brasiliensis* produjo micelio abundante que flotaba y se depositaba en el fondo. La estabilidad de estas características en los tres tiempos confirma que el medio mantuvo sus propiedades diferenciales y su utilidad para la promoción de crecimiento fúngico (19, 21).

TSB + LP (TSB con lecitina y polisorbato). Este medio incorpora neutralizantes para asegurar la recuperación microbiana en presencia de residuos de desinfectantes (9). Los resultados mostraron un comportamiento equivalente al TSB convencional: *S. aureus* y *P. aeruginosa* crecieron con turbidez intensa, mientras que *B. spizizenii* presentó turbidez suave y película superficial. La similitud de los resultados confirma que la adición de neutralizantes no afecta la calidad nutricional del medio, lo cual valida su uso en entornos de control de calidad donde la neutralización de biocidas es crítica (7, 9, 20).

Los resultados muestran que los caldos evaluados mantuvieron una turbidez constante a lo largo de los días de estudio, evidenciando un crecimiento estable y uniforme en los microorganismos de referencia. En la mayoría de los casos se observó un valor de 2 (buen crecimiento), confirmando que los caldos conservaron su capacidad de promoción de crecimiento durante los 30 días de almacenamiento. No se registraron casos de inhibición ni ausencia de crecimiento (valor 0), lo que demuestra la estabilidad del medio y su idoneidad para su uso en pruebas de control microbiológico, conforme a los criterios establecidos por la ISO 11133 y la USP <61>.

3.3 Promoción de crecimiento Agares no selectivos

AGAR TSA: Los resultados encontrados para promoción de crecimiento, que se detallan en la tabla a continuación, concuerdan con lo descrito en la USP <61> y la ISO 11133; los cuales destacan la importancia de garantizar que los medios de cultivo mantengan su capacidad de recuperación a lo largo de la vida útil establecida, señalando que la pérdida significativa en un microorganismo trazador compromete la validez del lote [8, 21]. De acuerdo con la literatura, *S. aureus* suele ser un indicador sensible de deterioro en medios debido a su dependencia de condiciones nutricionales óptimas y su susceptibilidad a cambios en el almacenamiento [13, 15, 29]. Por otro lado los resultados muestran una caída al día 30, lo que sugiere que el TSA comienza a perder eficacia en la promoción de crecimiento para bacterias Gram positivas sensibles. lo cual limita su uso prolongado sin una reevaluación, como se observa en la siguiente tabla.

Por otro lado, *P. aeruginosa* mantuvo porcentajes de recuperación estables entre los tres tiempos, sin diferencias significativas ($p = 0.395$). Este resultado indica que el TSA conserva adecuadamente su capacidad para promover el crecimiento de bacterias Gram negativas exigentes, lo que coincide con lo reportado por Smith et al. [17] y lo establecido en la USP <62>, donde este microorganismo se utiliza para demostrar la ausencia de inhibición en medios generales. De manera similar, *B. subtilis* presentó valores consistentes entre los tres periodos ($p = 0.145$), lo que confirma la robustez de este organismo esporulado, frecuentemente utilizado en controles de promoción de crecimiento por su capacidad de resistir condiciones de almacenamiento y variaciones en el medio [36, 37]. En

cuanto a los hongos, *C. albicans* y *A. brasiliensis* tampoco evidenciaron diferencias significativas ($p = 0.321$ y $p = 0.237$, respectivamente), lo que refleja la estabilidad del TSA para el crecimiento de levaduras y mohos en el periodo evaluado. La literatura señala que estos organismos suelen ser menos sensibles a la pérdida de nutrientes en comparación con bacterias de rápido crecimiento, lo cual explica su estabilidad [15, 18, 36]. Sin embargo, la ligera tendencia a la disminución en *A. brasiliensis* hacia el día 30 podría estar relacionada con fenómenos de desecación del medio o cambios en la disponibilidad de nutrientes, como lo han reportado Becker et al. [36] y Sutton [19]

Tabla 7. Datos estadísticos del agar TSA

AGAR TSA				
Microorganismo	Día 1 (%)	Día 2 (%)	Día3 (%)	ANOVA
<i>Staphylococcus aureus</i>	100±8,33 ^{ab}	101±2,52 ^a	87±6,66 ^b	P=0.036*
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	94±8,32 ^a	94±2,52 ^a	93±6,66 ^a	P = 0.395 ^{ns}
<i>Bacillus subtilis</i>	87.6±9.07 ^a	98±2.00 ^a	84±9.07 ^a	p = 0.145 ^{ns}
<i>Candida albicans</i>	89 ±4.50 ^a	93±9.29 ^a	84±6.02 ^a	P =0.321 ^{ns}
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	92±9.07 ^a	99±3.60 ^a	85±11.50 ^a	P =0.237 ^{ns}

Agar TSA suplementado con lecitina y polisorbato (TSA+LP): mostró un comportamiento diferencial en comparación con el TSA convencional, especialmente en lo referente a microorganismos sensibles como *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Como se puede ver en la siguiente tabla, los resultados del ANOVA revelaron diferencias significativas en ambos casos ($p = 0.010$ y $p = 0.016$, respectivamente), con valores cercanos al 100% en los días 1 y 15, pero con descensos marcados hacia el día 30 (86%). Esto indica que, a pesar de que el suplemento con neutralizantes confiere al medio capacidad adicional para contrarrestar inhibidores químicos, la estabilidad en la promoción de crecimiento de estas bacterias tiende a deteriorarse después de dos semanas de almacenamiento. En el caso de *S. aureus*, la caída significativa al día 30 concuerda con lo observado previamente en el TSA sin aditivos, lo que reafirma su papel como un indicador crítico de pérdida de rendimiento. De acuerdo con la literatura, este microorganismo es especialmente susceptible a cambios en la disponibilidad de nutrientes y a procesos de envejecimiento del medio [13, 15, 29]. En entornos regulatorios, la USP <61> y la ISO 11133 recomiendan que las diferencias estadísticamente significativas deben considerarse al establecer la vigencia del medio, de manera que la disminución observada limita la estabilidad práctica de TSA+LP a 15 días, aun cuando los porcentajes de recuperación superan el 70% establecido como límite de aceptación [8, 21].

De forma similar, *P. aeruginosa* mostró recuperación adecuada en los días 1 y 15, pero una disminución estadísticamente significativa al día 30. Este hallazgo es relevante porque este microorganismo, además de ser un trazador de la USP <62>, es utilizado en estudios de promoción de crecimiento como un indicador de posibles inhibiciones. Aunque los neutralizantes presentes en el TSA+LP están diseñados para contrarrestar la acción de compuestos residuales, no impidieron la pérdida de capacidad del medio con el tiempo, lo que sugiere que los cambios se deben principalmente a deterioro físico-químico del agar y no a inhibición residual. Por el contrario, *B. subtilis*, *C. albicans* y *A. brasiliensis* no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los días evaluados ($p > 0.05$). Estos resultados son consistentes con lo reportado en estudios previos, donde organismos esporulados y hongos presentan una mayor resistencia a las variaciones de nutrientes y condiciones de almacenamiento [36, 37]. En este sentido, el TSA+LP mantuvo su estabilidad para estos microorganismos, confirmando que las principales limitaciones de vigencia se asocian a bacterias sensibles.

Tabla 8. Datos estadísticos del agar TSA+LP

AGAR TSA +LP				
Microorganismo	Día 1 (%)	Día 2 (%)	Día3 (%)	ANOVA
<i>Staphylococcus aureus</i>	99±6.6 ^a	99±0.57 ^a	86±2.08 ^b	p = 0.010*
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	95±2.65 ^{ab}	99±2.08 ^a	87±5.13 ^b	p = 0.016*

<i>Bacillus subtilis</i>	87±11.59 ^a	97±2.00 ^a	86±3.05 ^a	p = 0.209 ^{ns}
<i>Candida albicans</i>	92±3.46410 ^a	91±6.42 ^a	86±2.88 ^a	p = 0.301 ^{ns}
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	93±2.00 ^a	97±6.08 ^a	85±6.11 ^a	p = 0.086 ^{ns}

Agar TSA suplementado con lecitina, polisorbato y tiosulfato (TSA+LP+TIO): mostró un comportamiento estable en todos los microorganismos evaluados, ya que no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de recuperación entre los días 1, 15 y 30 ($p > 0.05$ en todos los casos) como se puede ver en la tabla a continuación. Los valores se mantuvieron dentro del rango aceptable establecido por la USP <61> y la ISO 11133, superando consistentemente el 70% mínimo requerido para demostrar promoción de crecimiento [8, 21].

En *Staphylococcus aureus*, el ANOVA arrojó un valor de $p = 0.207$, confirmando que no existieron diferencias entre los tres tiempos. A diferencia de lo observado en el TSA y en el TSA+LP, donde se reportaron caídas significativas al día 30, en este caso el suplemento con tiosulfato parece haber contribuido a una mayor estabilidad, posiblemente por su capacidad de neutralizar oxidantes residuales que podrían afectar el crecimiento de bacterias Gram positivas [13, 15]. Para *Pseudomonas aeruginosa*, se observó un comportamiento similar ($p = 0.115$), con valores entre el 84% y el 99% en los tres días de medición. Estos resultados sugieren que el TSA+LP+TIO ofrece condiciones estables para bacterias Gram negativas, lo cual coincide con lo descrito en estudios previos donde la adición de neutralizantes mejora la confiabilidad del medio frente a posibles residuos de desinfectantes [17, 19]. *Bacillus subtilis* también mostró un comportamiento consistente ($p = 0.134$), lo cual era esperable dado que este organismo esporulado suele presentar una recuperación estable en medios generales [36, 37]. De manera similar, *Candida albicans* ($p = 0.176$) y *Aspergillus brasiliensis* ($p = 0.467$) no presentaron diferencias significativas, confirmando que el TSA+LP+TIO mantiene su capacidad para sostener el crecimiento de hongos levaduriformes y filamentosos durante todo el periodo evaluado.

En conjunto, estos resultados sugieren que la adición de tiosulfato, junto con lecitina y polisorbato, confiere al TSA una mayor robustez y estabilidad en comparación con las formulaciones sin este neutralizante. La ausencia de diferencias significativas entre días respalda que el TSA+LP+TIO puede mantener su vigencia por al menos 30 días, cumpliendo con las recomendaciones regulatorias que exigen consistencia en la recuperación de los microorganismos trazadores [12, 16, 18]. Sin embargo, es importante señalar que, aunque no se encontraron diferencias estadísticas, sí se observa una ligera tendencia a la disminución en algunos casos (por ejemplo, en *P. aeruginosa* y *A. brasiliensis*), lo cual sugiere que periodos más largos de almacenamiento podrían llegar a comprometer el desempeño.

Tabla 9. Datos estadísticos del agar TSA+LP+TIO

Microorganismo	AGAR TSA +LP+TIO			ANOVA
	Día 1 (%)	Día 2 (%)	Día3 (%)	
<i>Staphylococcus aureus</i>	95±13.31 ^a	93±1.73 ^a	97±2.08 ^a	p = 0.207 ^{ns}
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	90±4.93 ^a	99±3.05 ^a	84±11.01 ^a	p = 0.115 ^{ns}
<i>Bacillus subtilis</i>	88± 5.19 ^a	94±2.08 ^a	84±6.65 ^a	p = 0.134 ^{ns}
<i>Candida albicans</i>	85±3.00 ^a	92±6.6 ^a	86±3.60 ^a	p = 0.176 ^{ns}
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	95±13.31 ^a	90± 4.93 ^a	86±3.05 ^a	p = 0.467 ^{ns}

Agar R2A: diseñado para la recuperación de microorganismos heterótrofos en ambientes de baja carga nutricional, presentó en este estudio un desempeño heterogéneo dependiendo del microorganismo evaluado. En términos generales, los resultados mostraron que *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Aspergillus brasiliensis* mantuvieron porcentajes de recuperación aceptables en los días 1, 15 y 30, sin diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) como se puede evidenciar en la tabla a continuación. Esto confirma que el R2A es un medio estable para bacterias y hongos filamentosos a lo largo de un periodo de almacenamiento de hasta 30 días, en concordancia con lo establecido en la USP <61> e ISO 11133,

que señalan que la recuperación debe permanecer dentro de un rango aceptable sin evidencias de inhibición [8, 21]. En *S. aureus*, la recuperación se mantuvo estable (90–96%) con un valor de $p = 0.664$, lo que indica que la sensibilidad de este microorganismo a cambios nutricionales o de almacenamiento no se manifestó de forma crítica en este medio. Un comportamiento similar se observó en *P. aeruginosa* ($p = 0.084$), cuyas recuperaciones oscilaron entre 88% y 96%, sin diferencias significativas, lo que concuerda con lo reportado por estudios previos donde esta bacteria muestra una adecuada adaptación a medios con baja concentración de nutrientes [17]. *B. subtilis* también mostró valores consistentes (83–91%) con un $p = 0.066$, confirmando que este organismo esporulado mantiene un crecimiento estable en R2A, tal como lo han descrito McKenney et al. [37]. En el caso de *E. coli*, los porcentajes se mantuvieron estables (93–97%) con $p = 0.618$, lo cual reafirma la idoneidad del medio para bacterias entéricas sin efectos inhibitorios. Finalmente, *A. brasiliensis* presentó valores entre 99% y 88%, con una ligera tendencia descendente hacia el día 30, pero sin significancia estadística ($p = 0.068$), lo que indica que el medio conserva su capacidad de recuperación para hongos filamentosos en el periodo evaluado.

En contraste, *Candida albicans* mostró un comportamiento particular y estadísticamente significativo ($p < 0.001$). Mientras que en el día 1 la recuperación fue de 84%, en el día 15 se observó un aumento marcado hasta 103%, seguido de una disminución al 87% en el día 30. El análisis post hoc (Tukey HSD) confirmó que el incremento observado en el día 15 fue significativamente mayor en comparación con los días 1 y 30, mientras que no existieron diferencias significativas entre estos últimos. Este resultado sugiere que el R2A puede favorecer de manera transitoria la recuperación de levaduras, posiblemente debido a la baja carga nutricional que reduce la competencia con bacterias de crecimiento rápido, pero que con el tiempo el deterioro del medio y factores como la desecación o el agotamiento de nutrientes limitan nuevamente la viabilidad de la especie. Situaciones similares han sido reportadas en estudios previos, donde levaduras como *C. albicans* mostraron variaciones de recuperación ligadas a la estabilidad del medio y a las condiciones de almacenamiento [12, 19].

Tabla 10. Datos estadísticos del agar R2A

Microorganismo	AGAR R2A			ANOVA
	Día 1 (%)	Día 2 (%)	Día 3 (%)	
<i>Staphylococcus aureus</i>	96±10.40 ^a	93±6.65 ^a	90±3.51 ^a	$p = 0.664^{ns}$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	91± 3.46 ^a	96± 3.78 ^a	88±4.35 ^a	$p = 0.084^{ns}$
<i>Bacillus subtilis</i>	83±8.50 ^a	96±4.04 ^a	91±2.64 ^a	$p = 0.066^{ns}$
<i>Escherichia coli</i>	93±12.70 ^a	97±4.72 ^a	90±7.00 ^a	$p = 0.618^{ns}$
<i>Candida albicans</i>	84±4.72 ^b	103±1.73 ^a	87±2.6 ^b	$p = <0.01^*$
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	99±0.57 ^a	98±7.54 ^a	88±4.16 ^a	$p = 0.068^{ns}$

Sabouraud (SB): formulado para el aislamiento y la enumeración de levaduras y mohos gracias a su pH ácido y alto contenido de dextrosa/peptonas, mostró en este estudio un comportamiento globalmente estable durante los 30 días evaluados para los dos trazadores fúngicos recomendados: *Candida albicans* y *Aspergillus brasiliensis*. Para *C. albicans* se observaron valores medios de recuperación de 86 ± 14% (día 1), 95 ± 8% (día 15) y 77 ± 5% (día 30) tal como se evidencia en la tabla a continuación. Aunque existe una tendencia descendente hacia el día 30, el ANOVA no fue significativo ($p = 0.137$), y las letras superíndices homogéneas indican ausencia de diferencias post-hoc entre días. Operativamente, esto significa que la variación observada es compatible con la variabilidad experimental esperable con n pequeño (tres réplicas) y no evidencia una pérdida estadísticamente demostrable de la capacidad del medio para promover el crecimiento de la levadura dentro del periodo analizado. En *A. brasiliensis* la recuperación fue de 97 ± 10% (día 1), 100 ± 8% (día 15) y 86 ± 4% (día 30). De nuevo se aprecia una caída moderada al día 30, pero el ANOVA tampoco resultó significativo ($p \geq 0.05$, con superíndices homogéneos), por lo que no hay diferencias estadísticas entre los tres tiempos. Este patrón sugiere que el SB mantiene adecuadamente su desempeño para mohos durante la ventana de 30 días, aun con una ligera reducción final que podría atribuirse a desecación del agar, micro-cambios de pH por almacenamiento o consumo/oxidación de azúcares —factores conocidos que pueden afectar el crecimiento fúngico sin producir inhibición real.

Desde el punto de vista regulatorio, tanto USP <61>/<62> como ISO 11133 requieren que los medios demuestren promoción de crecimiento con cepas trazadoras durante su vida útil y, en la práctica, se acepta una recuperación $\geq 70\%$ frente al medio de referencia para levaduras y mohos, además de consistencia temporal [8, 21]. Todos los promedios observados en SB permanecen por encima del 70%, y la ausencia de diferencias significativas respalda que el medio cumple con los criterios de desempeño en el intervalo evaluado. Coincide además con la literatura técnica de control de medios, que describe a los hongos como menos sensibles que bacterias Gram positivas a pequeñas variaciones físico-químicas del medio, especialmente en formulaciones ácidas como Sabouraud [15, 19]. No obstante, la tendencia descendente en ambos organismos al día 30 —más evidente en *C. albicans* (95%→77%)— es operativamente relevante y merece seguimiento, aun cuando no sea estadísticamente significativa con el tamaño muestral disponible. Para minimizar ese deterioro práctico, es recomendable: (i) controlar el pH del SB al preparar y previo a su uso; (ii) evitar pérdida de humedad (sellado adecuado, bolsas barrera, almacenamiento a 2–8 °C y protección de luz); (iii) vigilar la gelificación y la altura de vertido; y (iv) mantener tendencias de % de recuperación por lote/tiempo como parte del programa de control continuo de medios (GPT trending) [12, 16, 18].

Tabla 11. Datos estadísticos del agar Sabouraud

AGAR SB				
Microorganismo	Día 1 (%)	Día 2 (%)	Día3 (%)	ANOVA
<i>Candida albicans</i>	86± 14.18 ^a	95±7.50 ^a	77±4.58 ^a	p = 0.137 ^{ns}
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	97± 9.53 ^a	100±7.6 ^a	86± 3.51 ^a	p = 0.129 ^{ns}

Sabouraud suplementado con lecitina y polisorbato (SB+LP): se evaluó con *Candida albicans* y *Aspergillus brasiliensis*, ambos considerados microorganismos trazadores de referencia para validar la capacidad de medios destinados al aislamiento de levaduras y mohos. Los resultados mostraron porcentajes de recuperación adecuados en los tres tiempos analizados (días 1, 15 y 30), con valores siempre superiores al 70% establecido por la USP <61> e ISO 11133 como criterio mínimo de aceptación.

En el caso de *Candida albicans*, los valores fueron de 90% en el día 1, 94% en el día 15 y 86% en el día 30 como se evidencia en la siguiente tabla. Aunque se evidenció una ligera disminución hacia el final del periodo, el análisis estadístico no indicó diferencias significativas entre los tres tiempos ($p = 0.222$), y las letras homogéneas en el análisis post hoc confirman que las variaciones corresponden a la dispersión natural de los datos. Estos resultados sugieren que el SB+LP conserva su capacidad para promover el crecimiento de levaduras en condiciones estables durante 30 días, lo que coincide con estudios previos que muestran que las levaduras suelen ser menos sensibles que bacterias Gram positivas a pequeños cambios en el medio [15, 19]. Para *Aspergillus brasiliensis*, los valores se mantuvieron en 101% en el día 1, 100% en el día 15 y 91% en el día 30, también sin diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.289$). Este comportamiento confirma la estabilidad del SB+LP para la recuperación de mohos durante todo el periodo de almacenamiento evaluado, incluso frente a ligeras variaciones en los valores medios, las cuales no comprometen la validez del medio. La adición de lecitina y polisorbato, conocidos neutralizantes de compuestos residuales como desinfectantes o detergentes, no afectó negativamente el rendimiento del medio, manteniendo la robustez del Sabouraud en términos de promoción de crecimiento.

Tabla 12. Datos estadísticos del agar Sabouraud + LP

AGAR SB+LP				
Microorganismo	Día 1 (%)	Día 2 (%)	Día3 (%)	ANOVA
<i>Candida albicans</i>	90±4.16 ^a	94±6.11 ^a	86±5.033 ^a	p = 0.222 ^{ns}
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	101±11.93	100±4.93	91±4.04	p = 0.289 ^{ns}

Agar cromogénico: constituye una herramienta diferencial en el control microbiológico farmacéutico, ya que permite la recuperación de microorganismos objetivo mediante reacciones enzimáticas específicas, garantizando la identificación presuntiva y la cuantificación confiable en ensayos de promoción de crecimiento y verificación de

medios. En el presente estudio se evaluó su desempeño frente a *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*, dos de los microorganismos trazadores recomendados por la USP y la ISO en la verificación de medios de cultivo [8, 21].

Los resultados de la tabla a continuación, demostraron que *P. aeruginosa* presentó una recuperación de $93 \pm 8.08\%$ en el Día 1, aumentando a $98 \pm 6.65\%$ en el Día 15, y descendiendo posteriormente a $82 \pm 5.85\%$ en el Día 30, mientras que *E. coli* mostró $98 \pm 10.50\%$ en el Día 1, $101 \pm 2.64\%$ en el Día 15 y $87 \pm 6.50\%$ en el Día 30. A pesar de esta tendencia descendente al final del periodo, el análisis estadístico (ANOVA) indicó que las diferencias no fueron significativas para ninguno de los dos microorganismos ($p = 0.077$ para *P. aeruginosa* y $p = 0.138$ para *E. coli*). Esto evidencia que el agar cromogénico mantiene su productividad de manera consistente durante los primeros 15 días, alcanzando valores óptimos de recuperación, y que, aunque se observa una ligera disminución en el Día 30, los porcentajes se mantuvieron siempre por encima del 70%, criterio mínimo de aceptación establecido por la ISO 11133:2014 para la verificación de medios de cultivo [8]. La reducción observada al Día 30 puede explicarse por fenómenos asociados a la estabilidad de los componentes cromogénicos y del agar durante el almacenamiento, como la degradación de los sustratos cromogénicos o cambios en el pH, que podrían afectar la intensidad de la reacción enzimática sin comprometer de forma crítica la recuperación [13, 15]. Este comportamiento ha sido descrito previamente como una limitación de los medios diferenciales, que requieren condiciones de almacenamiento estrictas para mantener su rendimiento [33].

Desde el punto de vista regulatorio, los resultados obtenidos cumplen con lo exigido por la USP <61> y <62>, que establecen que los medios utilizados en la industria farmacéutica deben demostrar capacidad para recuperar microorganismos trazadores de manera confiable durante su vida útil declarada [21]. El hecho de que las diferencias no fueran estadísticamente significativas respalda que el medio es apto para su uso hasta 30 días, aunque en términos de robustez los mejores resultados se observaron al Día 15, lo que sugiere un periodo de uso más conservador en entornos bajo Buenas Prácticas de Manufactura (GMP) [11, 28].

Tabla 13. Datos estadísticos del agar cromogenico

Microorganismo	Agar Cromogenico			ANOVA
	Día 1 (%)	Día 2 (%)	Día3 (%)	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	93 ± 8.08^a	98 ± 6.65^a	82 ± 5.85^a	$p = 0.077^{ns}$
<i>Escherichia coli</i>	98 ± 10.50^a	101 ± 2.64^a	87 ± 6.50^a	$p = 0.138^{ns}$

3.4 Promoción de crecimiento Agares selectivos

Agar selectivo para *Burkholderia cepacia*: se emplea en la detección de contaminaciones críticas en la industria farmacéutica, dado que estas especies representan un riesgo en productos no estériles, especialmente soluciones acuosas y productos inhalados. En este estudio se evaluaron tres especies representativas: *B. cepacia*, *B. cenocepacia* y *B. multivorans*, durante 30 días de almacenamiento del medio. Los resultados mostraron que ninguno de los tres microorganismos presentó diferencias estadísticamente significativas en los porcentajes de recuperación entre los días 1, 15 y 30 ($p = 0.143$ para *B. cepacia*, $p = 0.171$ para *B. cenocepacia* y $p = 0.103$ para *B. multivorans*) como se puede ver en la siguiente tabla. Esto indica que el agar *Burkholderia* mantiene su capacidad de promoción de crecimiento dentro de parámetros aceptables durante el periodo evaluado. En el caso de *B. cepacia*, la recuperación pasó de 86% en el día 1 a 95% en el día 15, con un descenso posterior al 76% en el día 30. Aunque esta caída podría sugerir un deterioro en la capacidad del medio hacia el final del periodo, estadísticamente no resultó significativa. De manera similar, *B. cenocepacia* mostró un comportamiento estable con ligeras fluctuaciones (82% → 95% → 80%), mientras que *B. multivorans* registró valores de 86% en el día 1, 96% en el día 15 y 79% en el día 30, también sin diferencias relevantes.

Estos resultados cumplen con los criterios establecidos en la USP <60>, que requieren que los medios de cultivo selectivos para BCC sean capaces de recuperar las especies trazadoras a lo largo de su vida útil. Además, todos

los porcentajes observados se encuentran por encima del límite mínimo del 70% exigido por la ISO 11133 y las guías de la USP, confirmando la idoneidad del medio. La ligera tendencia descendente observada al día 30 podría atribuirse a factores de almacenamiento como desecación, cambios en la osmolaridad o pérdida de estabilidad de los componentes selectivos, lo cual ya ha sido descrito en estudios previos sobre medios selectivos [13, 15, 19].

La selectividad de un medio de cultivo es un aspecto crítico en su validación, ya que determina su capacidad de inhibir microorganismos no deseados sin afectar el crecimiento de las especies diana. En este caso, el agar *Burkholderia* fue evaluado frente a dos microorganismos interferentes de relevancia en la industria farmacéutica: *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, ambos inoculados en concentraciones elevadas (~10⁵ UFC/placa) para representar un desafío al sistema selectivo. Los resultados mostraron que ninguno de los dos microorganismos creció en el agar *Burkholderia* tras 72 h de incubación a 30–35 °C, mientras que en el control no selectivo (TSA) se observó un crecimiento abundante y característico. Este hallazgo confirma que los agentes selectivos presentes en la formulación del medio ejercen un efecto inhibitorio eficaz contra flora acompañante habitual, lo cual es coherente con lo descrito en la literatura sobre el desempeño de los medios para detección de *Burkholderia cepacia* complex (BCC) [13, 15, 19].

Desde el punto de vista regulatorio, las farmacopeas (USP <60>, ISO 11133) establecen que un medio selectivo debe cumplir con dos criterios fundamentales: recuperar adecuadamente las cepas diana y suprimir los microorganismos interferentes. En este estudio, ya se había verificado la promoción de crecimiento con especies representativas del complejo (*B. cepacia*, *B. cenocepacia* y *B. multivorans*), mientras que la prueba de selectividad demostró una inhibición completa de los interferentes. Por tanto, el medio cumple satisfactoriamente con los requerimientos internacionales para su uso en control de calidad de productos no estériles.

Tabla 14. Datos estadísticos del agar *Burkholderia*

Microorganismo	AGAR <i>Burkholderia</i>			ANOVA
	Día 1 (%)	Día 2 (%)	Día 3 (%)	
<i>Burkholderia cepacia</i>	86.6667±14.15 ^a	95.0000±8.18 ^a	75.6667±6.50 ^a	p = 0.143 ^{ns}
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	82±1.52 ^a	95±8.18 ^a	80±12.66 ^a	p = 0.171 ^{ns}
<i>Burkholderia multivorans</i>	86±4.16 ^a	96±10.58 ^a	79±7.50 ^a	p = 0.103 ^{ns}

Agar Cetrimide: es reconocido como el medio de referencia para la recuperación selectiva de *Pseudomonas aeruginosa*, debido a la acción inhibitoria del catión cuaternario de amonio cetrimida, que suprime flora acompañante y permite la diferenciación de colonias características por la producción de pigmentos como piocianina y fluoresceína [39, 40]. Su utilización está normada en la USP <62> y en la ISO 11133 como parte de los ensayos de control microbiológico en productos no estériles.

En el presente trabajo, se observó que el medio presentó variaciones significativas en la recuperación de *P. aeruginosa* a lo largo del almacenamiento (ANOVA, p = 0.042). Al Día 1, la recuperación fue de 88 ± 1.52%, incrementándose a 95 ± 5.03% en el Día 15, lo que corresponde al punto de mayor productividad. Sin embargo, al Día 30, la recuperación descendió a 80 ± 8.18%, siendo significativamente menor respecto al Día 15, esto se puede observar en la siguiente tabla. Esta tendencia sugiere que, aunque el medio conserva su capacidad selectiva, su potencial de promoción de crecimiento disminuye al final del periodo de vida útil. La reducción de recuperación hacia el Día 30 puede asociarse a factores como deshidratación del agar, cambios de pH o pérdida de eficacia de los agentes selectivos durante el almacenamiento, fenómenos descritos en la literatura como determinantes en la pérdida de desempeño de medios selectivos [8, 13, 15]. A pesar de ello, todos los valores se mantuvieron por encima del umbral de aceptación del 70% recomendado por la ISO 11133 y la USP <62>, lo que demuestra que el medio conserva un nivel funcional adecuado hasta el final del periodo evaluado.

Adicionalmente, el agar Cetrimide superó la prueba de inhibición frente a *Escherichia coli*, empleando la técnica de inoculación a una concentración de 10⁵ UFC/placa. En estas condiciones de desafío, no se observó crecimiento del microorganismo interferente en el medio selectivo, mientras que en el control no selectivo (TSA) se recuperó crecimiento abundante. Este resultado confirma que el medio no solo es productivo para *P. aeruginosa*, sino

también altamente selectivo, suprimiendo eficazmente bacterias competidoras relevantes como *E. coli*, lo que es coherente con los criterios de la USP <62> y de la OMS para validar la selectividad de medios destinados al control microbiológico [11, 21, 28].

Tabla 15. Datos estadísticos del agar Cetrimide

Microorganismo	Agar Cetrimide			ANOVA
	Día 1 (%)	Día 15 (%)	Día30 (%)	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	88±1.52 ^{ab}	95±5.03 ^a	80±8.18 ^b	p = .042 ^{ns}

Agar eosina azul de metileno (EMB): es un medio diferencial y parcialmente selectivo recomendado en ensayos de control microbiológico de la industria farmacéutica, ya que permite la recuperación de bacterias entéricas como *Escherichia coli*, cuya fermentación de lactosa produce colonias con brillo metálico característico [39, 40]. Además, las farmacopeas (USP <62>) y la norma ISO 11133 recomiendan a *E. coli* como microorganismo trazador esencial en la verificación de medios de cultivo [8, 21]. En este estudio, el EMB mostró una recuperación inicial de 94 ± 5.68% en el Día 1 y 96 ± 1.73% en el Día 15, evidenciando un desempeño óptimo en las dos primeras semanas de almacenamiento. Sin embargo, en el Día 30 la recuperación descendió significativamente a 81 ± 4.50% (ANOVA, p = 0.012) tal como se ve en la tabla a continuación, lo que indica una pérdida de productividad con el paso del tiempo. Aunque todos los valores se mantuvieron por encima del 70% exigido por la normativa internacional, la diferencia estadísticamente significativa sugiere que la vida útil práctica del medio debería limitarse a los primeros 15 días para garantizar mayor robustez en la detección de *E. coli*.

La reducción observada hacia el Día 30 puede atribuirse a procesos de degradación físico-química del medio durante el almacenamiento, como desecación de la superficie, alteraciones de pH o pérdida de eficacia de los colorantes eosina y azul de metileno, los cuales son fundamentales tanto para la selectividad como para la diferenciación de colonias [13, 15, 33]. Estos fenómenos han sido descritos previamente como limitantes en la estabilidad de medios diferenciales almacenados por periodos prolongados.

En cuanto a la prueba de inhibición, el EMB demostró ser altamente selectivo al suprimir completamente el crecimiento de *Staphylococcus aureus* cuando se inoculó a una concentración de 10⁵ UFC/placa. Este resultado, junto con la recuperación satisfactoria de *E. coli*, confirma que el medio cumple con los criterios regulatorios de productividad y selectividad establecidos por la USP y la OMS para medios diferenciales [11, 21, 28].

Tabla 16. Datos estadísticos del agar EMB

Microorganismo	Agar EMB			ANOVA
	Día 1 (%)	Día 2 (%)	Día3 (%)	
<i>Escherichia coli</i>	94±5.68 ^a	96±1.73 ^a	81±4.50 ^b	p = 0 .012 [*]

Agar MacConkey: es un medio diferencial y selectivo ampliamente utilizado en microbiología industrial y farmacéutica para la recuperación de bacilos Gram negativos y la diferenciación de fermentadores de lactosa [39, 40]. Su desempeño está directamente asociado a la acción de inhibidores como las sales biliares y el violeta de cristal, que suprimen Gram positivos, y al uso del rojo neutro como indicador de fermentación [21]. En el presente estudio, se evaluó la productividad de este medio frente a *Escherichia coli* en tres momentos de almacenamiento (Día 1, Día 15 y Día 30), así como su selectividad mediante la exposición a *Staphylococcus aureus*.

Los resultados mostraron que *E. coli* presentó porcentajes de recuperación de 86 ± 5.19% en el Día 1, 95 ± 5.03% en el Día 15 y 78 ± 10.21% en el Día 30, sin diferencias significativas entre grupos (ANOVA, p = 0.073) como se

ve en la siguiente tabla. Estos valores confirman que el medio cumple con los criterios de aceptación internacionales, al mantener recuperaciones $\geq 70\%$ a lo largo del periodo de estudio [8]. Sin embargo, la tendencia decreciente observada al Día 30, aunque no estadísticamente significativa, refleja una pérdida de robustez práctica que podría asociarse a fenómenos de deshidratación, cambios de pH o degradación de componentes diferenciales como el rojo neutro o las sales biliares, factores previamente documentados en la literatura como limitantes en la estabilidad de medios diferenciales [13, 15, 33].

En términos de selectividad, el agar MacConkey demostró ser eficaz al inhibir completamente el crecimiento de *Staphylococcus aureus* cuando se inoculó a una concentración de 10^5 UFC/placa. Este hallazgo confirma la adecuada acción de los inhibidores del medio, en concordancia con lo establecido por la USP <62> y la ISO 11133, que exigen la ausencia de crecimiento de interferentes representativos en medios selectivos [8, 21]. El cumplimiento simultáneo de las pruebas de productividad y selectividad respalda la idoneidad del MacConkey para aplicaciones en control de calidad farmacéutico, donde se requiere no solo la recuperación de microorganismos trazadores, sino también la supresión confiable de flora no objetivo.

Tabla 17. Datos estadísticos del agar MacConkey

Agar AGAR MacConkey				
Microorganismo	Día 1 (%)	Día 2 (%)	Día3 (%)	ANOVA
<i>Escherichia coli</i>	86 \pm 5.19 ^a	95 \pm 5.03 ^a	78 \pm 10.21 ^a	p = 0. 073 ^{ns}

Agar Antibióticos N.º 1: es un medio recomendado por farmacopeas internacionales para ensayos de sensibilidad y potencia de antibióticos, diseñado para proporcionar un entorno nutritivo equilibrado que favorece el crecimiento de microorganismos de referencia sin interferir en la difusión de agentes antimicrobianos [14, 21]. Su formulación contiene peptona de caseína, extracto de carne, extracto de levadura y glucosa, lo cual asegura el aporte de aminoácidos, vitaminas y factores energéticos necesarios para el crecimiento uniforme de bacterias como *Bacillus subtilis* [12, 15].

En el presente estudio, se evaluó la productividad de este medio frente a *B. subtilis* en tres momentos de almacenamiento (Día 1, Día 15 y Día 30), así como su selectividad mediante la exposición de *Staphylococcus aureus* a la inhibición por *Pseudomonas aeruginosa*. Los resultados mostraron que *B. subtilis* presentó porcentajes de recuperación de 86 \pm 14.15% en el Día 1, 92 \pm 4.35% en el Día 15 y 82 \pm 10.96% en el Día 30, sin diferencias significativas entre grupos (ANOVA, p = 0.588) como se ve en la siguiente tabla. Estos valores confirman que el medio cumple con los criterios de aceptación establecidos en la USP y la ISO 11133, al mantener recuperaciones superiores al 70% durante el periodo de estudio [8, 21]. La estabilidad observada sugiere que el Agar Antibióticos N.º 1 conserva sus propiedades nutricionales durante al menos 30 días, aunque se observó una ligera tendencia descendente hacia el final del periodo, atribuible a procesos de desecación o pérdida de componentes activos [13, 15].

En términos de selectividad, el Agar Antibióticos N.º 1 demostró ser eficaz al inhibir completamente el crecimiento de *S. aureus* cuando se inoculó con *P. aeruginosa* a una concentración de 10^5 UFC/placa. Este hallazgo confirma la funcionalidad del medio en condiciones prácticas, ya que garantiza que no se favorece el desarrollo de microorganismos interferentes, en concordancia con los requisitos de la USP <62> y la ISO 11133 [8, 21]. El cumplimiento simultáneo de las pruebas de productividad y de selectividad refuerza la idoneidad del medio como soporte para ensayos de antibióticos en entornos regulados bajo Buenas Prácticas de Manufactura (GMP) [11, 28].

Tabla 18. Datos estadísticos del agar antibiótico No 1

Agar No 1				
Microorganismo	Día 1 (%)	Día 2 (%)	Día3 (%)	ANOVA
<i>Bacillus subtilis</i>	86 \pm 14.15 ^a	92 \pm 4.35 ^a	82 \pm 10.96 ^a	p =0.588 ^{ns}

Agar No. 11: corresponde a un medio experimental utilizado para evaluar la recuperación y estabilidad de microorganismos indicadores en ensayos de control de calidad microbiológico. Su formulación contiene nutrientes básicos que favorecen el crecimiento de bacterias Gram positivas como *Staphylococcus epidermidis*, además de componentes diferenciales que permiten monitorear la robustez del medio durante su periodo de almacenamiento. En el ámbito farmacéutico, este tipo de medios se utilizan como parte de la verificación secundaria en estudios de vigencia, con el fin de garantizar que la productividad no se vea comprometida por degradación de sus componentes [8, 21, 28].

En este estudio, los resultados mostraron que *S. epidermidis* presentó porcentajes de recuperación de $98 \pm 5.56\%$ en el Día 1, $93 \pm 2.51\%$ en el Día 15 y $85 \pm 7.81\%$ en el Día 30 como se evidencia en la tabla a continuación. Aunque se observó una tendencia decreciente en el porcentaje de recuperación hacia el último punto de muestreo, las diferencias no resultaron estadísticamente significativas (ANOVA, $p = 0.078$). Esto indica que el medio mantiene su productividad dentro de los límites de aceptación establecidos por la ISO 11133 y la USP <61>, que recomiendan una recuperación mínima del 70% en microorganismos trazadores [8, 21].

La disminución progresiva hacia el Día 30 podría asociarse a fenómenos físico-químicos como la pérdida de humedad, variaciones en el pH o degradación de nutrientes esenciales para la multiplicación de *Staphylococcus*, lo cual ha sido previamente reportado en estudios de estabilidad de medios de cultivo [13, 15, 33]. Sin embargo, la capacidad de mantener recuperaciones superiores al umbral crítico respalda la utilidad del Agar No. 11 durante al menos un mes de almacenamiento, garantizando la confiabilidad del ensayo en condiciones de laboratorio farmacéutico.

Tabla 19. Datos estadísticos del agar antibiótico No 11

Microorganismo	Agar No 11			
	Día 1 (%)	Día 2 (%)	Día3 (%)	ANOVA
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	98 ± 5.56^a	93 ± 2.51^a	85 ± 7.81^a	$p = 0.078^{ns}$

Agar Salado Manitol: es un medio selectivo y diferencial diseñado específicamente para favorecer el crecimiento de estafilococos halotolerantes, en particular *Staphylococcus aureus*, y al mismo tiempo inhibir el desarrollo de bacterias no tolerantes a altas concentraciones de sal [39, 40]. Su fórmula incluye un 7.5% de NaCl como agente selectivo, manitol como carbohidrato fermentable y rojo fenol como indicador de pH. Esta combinación permite discriminar *S. aureus* —capaz de fermentar manitol acidificando el medio y virando el color a amarillo— de otros estafilococos que no metabolizan este azúcar [21]. En el contexto farmacéutico, su uso está normado por estándares internacionales como USP <62> e ISO 11133, que lo recomiendan en ensayos de recuperación y selectividad [8, 21].

En el presente estudio, el desempeño del MSA se evaluó en términos de productividad frente a *S. aureus* y de selectividad frente *Escherichia coli*. En cuanto a la productividad, se obtuvieron porcentajes de recuperación de $94 \pm 13.79\%$ en el Día 1, $98 \pm 2.51\%$ en el Día 15 y $85 \pm 1.15\%$ en el Día 30 como se ve en la tabla a continuación, sin diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (ANOVA, $p = 0.200$). Estos valores superan el umbral de aceptación ($\geq 70\%$) establecido por la ISO 11133 y la USP, confirmando que el medio mantuvo su capacidad de recuperación durante el periodo analizado. No obstante, la disminución en la recuperación al Día 30, aunque no significativa, sugiere un inicio de deterioro físico-químico posiblemente asociado a deshidratación o pérdida de sensibilidad del indicador de pH, fenómenos documentados como factores que afectan la estabilidad de los medios diferenciales [13, 15, 33].

En términos de selectividad, el ensayo de inhibición realizado con *Escherichia coli* evidenció la eficacia del agar sal y manitol (MSA) para impedir el desarrollo de este microorganismo. La ausencia total de crecimiento confirma la acción selectiva del medio, atribuida a su alta concentración de cloruro de sodio (NaCl), que genera una presión osmótica elevada no tolerada por bacilos Gram negativos como *E. coli*. Este comportamiento concuerda con lo descrito en la literatura, donde se reporta que el MSA permite el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y otras

especies halotolerantes, mientras inhibe la flora Gram negativa no adaptada a ambientes con alta salinidad [40]. Estos resultados demuestran que el MSA cumple con los criterios regulatorios de selectividad establecidos por la USP <62>, garantizando su eficacia para la detección específica de *S. aureus* en muestras de interés farmacéutico [8, 21].

Tabla 20. Datos estadísticos del agar salado manitol

Microorganismo	Agar Salado manitol			ANOVA
	Día 1 (%)	Día 2 (%)	Día3 (%)	
<i>Staphylococcus aureus</i>	94±13.79 ^a	98±2.51 ^a	85±1.15 ^a	p = 0.200 ^{ns}

Agar VRBD (Violet Red Bile Dextrose): es un medio diferencial y selectivo empleado principalmente para la enumeración de bacterias coliformes y otras enterobacterias en productos farmacéuticos y alimentos [39, 40]. Su formulación contiene cristal violeta y sales biliares, que inhiben el crecimiento de bacterias Gram positivas, y dextrosa junto con el indicador rojo neutro, que permite diferenciar a los fermentadores de lactosa mediante la acidificación local [21]. En el ámbito farmacéutico, este medio resulta especialmente relevante en pruebas de control de calidad, al garantizar la recuperación de enterobacterias trazadoras como *Escherichia coli*, al tiempo que asegura la ausencia de crecimiento de microorganismos interferentes como *Staphylococcus aureus* [8, 22].

En este estudio, los resultados obtenidos para *Pseudomonas aeruginosa* mostraron recuperaciones de 86 ± 8.00% en el Día 1, 92.3 ± 6.8% en el Día 15 y 82 ± 7.5% en el Día 30, sin diferencias significativas entre grupos (ANOVA, p = 0.321). Estos valores confirman que el agar mantiene un desempeño aceptable para esta cepa, aunque se observa una tendencia decreciente hacia el Día 30, posiblemente asociada a fenómenos de deshidratación del medio, pérdida de nutrientes o alteración del pH [13, 15]. En el caso de *E. coli*, los porcentajes de recuperación fueron de 91 ± 2.00% en el Día 1, 98 ± 5.00% en el Día 15 y 82 ± 5.13% en el Día 30, con diferencias estadísticamente significativas entre los tiempos de almacenamiento (ANOVA, p = 0.012) todo estos resultados se pueden evidenciar en la siguiente tabla. Esto indica que la máxima productividad se alcanza en el Día 15, mientras que hacia el Día 30 existe una pérdida de robustez práctica que podría comprometer la reproducibilidad en entornos de control de calidad regulados [11, 28]. Tales hallazgos concuerdan con lo descrito en la literatura, donde se ha señalado que los medios biliares tienden a presentar inestabilidad en el tiempo debido a la degradación de sus componentes diferenciales [33].

En cuanto a la selectividad, el VRBD fue evaluado frente a *Staphylococcus aureus*, utilizando una inoculación de 10⁵ UFC/placa. Los resultados evidenciaron la ausencia total de crecimiento, confirmando la efectividad de los inhibidores del medio (cristal violeta y sales biliares). Este resultado es coherente con lo establecido por la USP <62> y la ISO 11133, que exigen la inhibición de Gram positivos representativos en este tipo de medios [8, 21].

Tabla 21. Datos estadísticos del agar VRBD

Microorganismo	Agar VRBD			ANOVA
	Día 1 (%)	Día 2 (%)	Día3 (%)	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	86±8.00 ^a	92.3333±6.8 ^a	82±7.50 ^a	p = 0.321 ^{ns}
<i>Escherichia coli</i>	91±2.00 ^{ab}	98±5.00 ^a	82±5.13 ^b	p = 0.012 [*]

3.4 Promoción de crecimiento fluidos de transporte

Buffer pH 8.0: es una solución empleada como fluido de transporte en microbiología farmacéutica, cuyo objetivo principal es preservar la viabilidad microbiana durante intervalos cortos de tiempo sin favorecer proliferación ni disminuciones drásticas en la población inicial [8, 11]. A diferencia de los medios sólidos, su acción no está dirigida a promover el crecimiento, sino a estabilizar la fisiología de las células, evitando cambios osmóticos o de pH que puedan comprometer la recuperación posterior en medios de cultivo nutritivos.

En este estudio se evaluó el desempeño del Buffer pH 8.0 mediante la inoculación de diferentes cepas de referencia (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* y *Aspergillus brasiliensis*) a una concentración aproximada de 10^4 UFC/mL, con mediciones de recuperación en tres tiempos de almacenamiento (Día 1, Día 15 y Día 30). Los resultados se expresaron como porcentajes de recuperación calculados en relación con el tiempo cero. Los datos de la tabla a continuación mostraron valores variables, algunos negativos (indicando reducción en la viabilidad respecto al control) y otros positivos (sugiriendo ligeros aumentos atribuibles al margen experimental). Por ejemplo, *S. aureus* presentó un aumento moderado hacia el Día 30 ($5 \pm 5.50\%$), mientras que *B. subtilis* pasó de valores negativos en el Día 1 ($-3 \pm 1.7\%$) a positivos al Día 30 ($1 \pm 2.88\%$). No obstante, en todos los casos, el análisis ANOVA evidenció ausencia de diferencias significativas entre días ($p > 0.05$ en todos los microorganismos).

Estos hallazgos son consistentes con la función esperada de los fluidos de transporte: mantener la estabilidad celular sin promover multiplicación activa. El hecho de que las variaciones observadas se encuentren dentro del rango aceptado ($\pm 30\%$ de la población inicial) confirma que el Buffer pH 8.0 cumple con los criterios establecidos en la ISO 11133 y en la USP <61>/<62>, donde se estipula que un medio de transporte debe garantizar la recuperación microbiana sin inducir cambios significativos en la población [8, 21]. Desde el punto de vista práctico, la tendencia de ciertos microorganismos a mostrar ligeros incrementos o decrementos a lo largo del tiempo podría atribuirse a factores técnicos como el estrés celular inicial durante la dilución, la sensibilidad diferencial de cada especie al pH alcalino, o la posible activación/inactivación de mecanismos de resistencia en bacterias esporuladas como *B. subtilis* [37, 42]. En levaduras y hongos, como *Candida albicans* y *A. brasiliensis*, los resultados cercanos a cero refuerzan la estabilidad del sistema, alineándose con reportes previos sobre la tolerancia de estos eucariotas a variaciones de pH en soluciones de transporte [12, 15].

Tabla 22. Datos estadísticos Buffer 8.0

Microorganismo	Buffer 8.0			ANOVA
	Día 1 (%)	Día 15 (%)	Día 30 (%)	
<i>Staphylococcus aureus</i>	-1 ± 1.52^a	0 ± 4.04^a	5 ± 5.50^a	$P = 0.173^{ns}$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2 ± 2.51^a	0 ± 4.04^a	2 ± 2.51^a	$P = 0.597^{ns}$
<i>Bacillus subtilis</i>	-3 ± 1.7^a	-1 ± 2.88^a	1 ± 2.88^a	$p = 0.186^{ns}$
<i>Candida albicans</i>	0 ± 7.00^a	-3 ± 3.60^a	-2 ± 6.80^a	$P = 0.819^{ns}$
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	-1 ± 2.88^a	-2 ± 2.51^a	-4 ± 5.13^a	$P = 0.673^{ns}$

Fluido D: es una solución de transporte frecuentemente utilizada en microbiología farmacéutica para evaluar la viabilidad y estabilidad de los microorganismos bajo condiciones de almacenamiento temporal. Su función principal es mantener la población microbiana sin alteraciones significativas, asegurando que el inóculo se conserve estable hasta el momento de la siembra en medios sólidos, en concordancia con lo establecido en la USP <61>, USP <62> e ISO 11133 para fluidos de transporte [8, 21]. El criterio de aceptación establece que la recuperación microbiana no debe variar en más de un $\pm 30\%$ respecto a la concentración inicial [12].

En este estudio, los resultados expuestos en la siguiente tabla, obtenidos para los diferentes microorganismos mostraron variaciones mínimas y en algunos casos negativas, que representan reducciones esperadas en la recuperación debido al estrés osmótico y la falta de nutrientes del fluido, pero sin superar el umbral del 30%. Para *Staphylococcus aureus*, las recuperaciones oscilaron entre $3 \pm 2.88\%$ el Día 1, $-1 \pm 2.88\%$ el Día 15 y $0 \pm 4.04\%$ el Día 30, sin diferencias significativas (ANOVA, $p = 0.228$). Este patrón refleja que la viabilidad de la cepa se mantuvo en niveles aceptables, confirmando que el fluido cumple con los criterios internacionales de desempeño.

En el caso de *Pseudomonas aeruginosa*, los resultados variaron entre $2 \pm 2.51\%$ el Día 1 y valores ligeramente negativos en los días posteriores, aunque no significativos (ANOVA, $p = 0.686$). Este comportamiento puede estar asociado a la sensibilidad de la especie a condiciones de baja disponibilidad nutricional, ya descrita en ensayos de estabilidad microbiana en soluciones de transporte [33]. *Bacillus subtilis* mostró una tendencia a la reducción en el Día 15 ($-5 \pm 1.1\%$), pero sin significancia estadística ($p = 0.079$), lo que sugiere que las esporas mantienen

su viabilidad dentro del rango aceptado. Para *Candida albicans*, los valores oscilaron sin presentar tendencias críticas ($p = 0.731$), mientras que en *Aspergillus brasiliensis* se observaron oscilaciones entre -2 y 2%, igualmente no significativas ($p = 0.221$). Estos hallazgos coinciden con lo reportado en estudios de estabilidad de hongos en fluidos de transporte, donde la recuperación puede presentar ligeras fluctuaciones sin comprometer la aceptabilidad del sistema [13, 15].

En conjunto, los resultados confirman que el Fluido D cumple con el criterio de estabilidad microbiológica, al no presentar aumentos ni disminuciones superiores al 30% en ninguna de las cepas evaluadas durante los tres puntos de muestreo. La ausencia de diferencias significativas respalda su idoneidad para el uso en ensayos de promoción de crecimiento y control de medios farmacéuticos, en línea con lo exigido por la farmacopea y las guías ISO. No obstante, la ligera reducción observada en algunas especies sugiere la necesidad de realizar controles periódicos de desempeño, especialmente cuando los fluidos se almacenan por periodos cercanos a los 30 días.

Tabla 23. Datos estadísticos del fluido D

Microorganismo	Fluido D			ANOVA
	Día 1 (%)	Día 15 (%)	Día30 (%)	
<i>Staphylococcus aureus</i>	3±2.88 ^a	-1±2.88 ^a	0±4.04 ^a	P=0.228 ^{ns}
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2±2.51 ^a	-0.66±7.09 ^a	-0.66±5.13 ^a	P = 0.686 ^{ns}
<i>Bacillus subtilis</i>	-1±1.52 ^a	-5±1.1 ^a	-1±2.88 ^a	p = 0.079 ^{ns}
<i>Candida albicans</i>	-2±2.51 ^a	0.66±6.02 ^a	0±5.00 ^a	P =0.731 ^{ns}
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	-±2.88 ^a	2±3.60 ^a	-2±2.51 ^a	P =0.221 ^{ns}

Fluido A: es una solución de transporte diseñada para mantener la viabilidad microbiana en condiciones transitorias, evitando tanto la proliferación excesiva como la pérdida de células viables. Su formulación suele incluir tampones fosfato y agentes osmóticos que estabilizan la membrana celular, con el objetivo de proporcionar un ambiente neutro y no nutritivo que permita conservar la población microbiana durante periodos limitados de tiempo [8, 11].

En este estudio, se evaluó el desempeño del Fluido A frente a *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* y *Aspergillus brasiliensis*, considerando tres puntos de almacenamiento (Día 1, Día 15 y Día 30). Los resultados mostrados en la siguiente tabla, muestran porcentajes de recuperación con variaciones moderadas, pero sin diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los casos (ANOVA, $p > 0.05$). Para *S. aureus*, las recuperaciones oscilaron entre $0.77 \pm 2.27\%$ y $1 \pm 2.64\%$, evidenciando una tendencia estable sin pérdida significativa de viabilidad. De manera similar, *P. aeruginosa* presentó valores entre $-4 \pm 4.6\%$ y $2 \pm 4.06\%$, lo que refleja fluctuaciones dentro del margen de error experimental. En el caso de *B. subtilis*, los porcentajes se mantuvieron en un rango positivo ($2 \pm 4.61\%$ al Día 1 y $1 \pm 3.60\%$ al Día 30), confirmando la capacidad del fluido para preservar la viabilidad sin promover crecimiento adicional. Tanto *C. albicans* como *A. brasiliensis* mostraron ligeras variaciones negativas en ciertos tiempos, pero sin sobrepasar el criterio de aceptación de $\pm 30\%$ establecido por la ISO 11133 y la USP <61> [8, 21].

Estos hallazgos sugieren que el Fluido A cumple con los criterios de transporte microbiológico, al mantener la estabilidad de los microorganismos trazadores sin promover proliferación ni reducción significativa de la viabilidad celular. La ausencia de diferencias significativas respalda su aplicabilidad en laboratorios farmacéuticos, donde se requiere asegurar que las cepas de referencia o trazadoras lleguen al medio de ensayo sin alteraciones cuantitativas relevantes [12, 18].

Tabla 24. Datos estadísticos del fluido A

Microorganismo	Fluido A			ANOVA
	Día 1 (%)	Día 15 (%)	Día30 (%)	
<i>Staphylococcus aureus</i>	1±2.64 ^a	1±2.64 ^a	0.77±2.27 ^a	P=0.937 ^{ns}
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-4±4.6 ^a	2±4.06 ^a	-2±7.50 ^a	P =0.322 ^{ns}

<i>Bacillus subtilis</i>	2±4.61 ^a	1±9.60 ^a	1±3.60 ^a	p =0.947 ^{ns}
<i>Candida albicans</i>	1±6.08 ^a	-3±3.60 ^a	2±2.51 ^a	P =0.327 ^{ns}
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	0.66±4.04 ^a	-1±5.19 ^a	1±4.16 ^a	P =0.773 ^{ns}

Solución fosfato pH 7,2: es un fluido de transporte y diluyente ampliamente utilizado en microbiología industrial y farmacéutica por su capacidad de mantener condiciones isotónicas y un pH fisiológico cercano a la neutralidad, lo que contribuye a preservar la integridad celular durante procesos de manipulación y almacenamiento de corto plazo [8, 11]. Su formulación se basa principalmente en sales de fosfato, que actúan como agentes tamponadores, evitando fluctuaciones bruscas de pH que podrían comprometer la viabilidad microbiana [21]. Este tipo de soluciones no aportan nutrientes significativos, garantizando que no se promueva proliferación de los microorganismos, lo cual es un requisito esencial en pruebas reguladas bajo ISO 11133 y USP <61> [8, 21].

En este estudio se evaluó el desempeño de la solución fosfato pH 7,2 frente a *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* y *Aspergillus brasiliensis* en tres tiempos de almacenamiento (Día 1, Día 15 y Día 30). Los resultados mostraron comportamientos diferenciales entre especies, destacando que solo *P. aeruginosa* (p = 0.026) y *C. albicans* (p = 0.020) presentaron diferencias estadísticamente significativas, mientras que las demás cepas no mostraron variaciones relevantes (p > 0.05) como se puede ver en la tabla a continuación.

Para *S. aureus*, los valores oscilaron entre -1 ± 1.52% y 1 ± 5.68%, lo que refleja una estabilidad aceptable, sin alteraciones significativas en la recuperación. *P. aeruginosa*, en cambio, mostró una disminución en la recuperación hacia el día 30 (-1 ± 1.73%), lo que sugiere una reducción en la capacidad de la solución para mantener su viabilidad en periodos prolongados. Este hallazgo concuerda con reportes previos que señalan la sensibilidad de esta especie a variaciones osmóticas y al envejecimiento de soluciones tampón [12, 18]. En el caso de *B. subtilis*, los porcentajes fluctuaron levemente en torno a la neutralidad (-0.66% a 0.3%), confirmando que la solución fosfato mantiene la integridad de esporas bacterianas sin promover proliferación. Para *C. albicans*, se observó una reducción marcada en el día 15 (-5.0%), seguida de una recuperación parcial al día 30 (1.3%), indicando una posible susceptibilidad a la deshidratación temporal dentro de la solución. Finalmente, *A. brasiliensis* mostró variaciones mínimas y no significativas (-1.73% a -0.66%), lo que confirma la estabilidad de hongos filamentosos en este tipo de matrices de transporte.

En términos de criterios regulatorios, los resultados se mantienen dentro del rango aceptado de ±30% de variación, exigido por ISO 11133 y USP <61> [8, 21], lo cual valida el desempeño del fluido como una solución adecuada para el transporte de trazadores microbiológicos. Sin embargo, el comportamiento de *P. aeruginosa* y *C. albicans* resalta la importancia de establecer límites de vida útil conservadores, sugiriendo que esta solución mantiene un mejor desempeño en intervalos no superiores a 15 días.

Tabla 25. Datos estadísticos de la solución de fosfato Ph 7,2

Microorganismo	SOLUCIÓN FOSFATO pH 7,2			ANOVA
	Día 1 (%)	Día 15 (%)	Día30 (%)	
<i>Staphylococcus aureus</i>	-1±1.52 ^a	1±1.15 ^a	1±5.68 ^a	P=0.476 ^{ns}
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4±1.15 ^a	4±2.64 ^a	-1±1.73 ^b	P =0.026*
<i>Bacillus subtilis</i>	-0.66±4.04 ^a	-2±6.24 ^a	0±3.00 ^a	p =0.826 ^{ns}
<i>Candida albicans</i>	2±2.51 ^a	-5±0.00 ^b	1±3.46 ^{ab}	P =0.02*
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	-1±1.73 ^a	0.33±6.80 ^a	-0.66±4.04 ^a	P =0.937 ^{ns}

Solución salina: es uno de los fluidos de transporte más simples y tradicionales empleados en microbiología, caracterizada por su composición isotónica de cloruro de sodio (NaCl) al 0,85–0,9% en agua purificada. Su función principal radica en mantener la integridad osmótica de las células bacterianas y fúngicas sin proveer nutrientes que promuevan la proliferación. Al ser un medio inerte, se espera que conserve la viabilidad microbiana durante periodos cortos, pero con limitaciones frente a soluciones tampón más complejas o medios con estabilizadores [8, 11].

En este estudio, se evaluó la capacidad de la solución salina para preservar la viabilidad de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* y *Aspergillus brasiliensis* en tres tiempos de almacenamiento (Día 1, Día 15 y Día 30). Los resultados de la tabla a continuación, evidencian fluctuaciones en los porcentajes de recuperación, con valores que oscilaron entre reducciones ligeras ($-4 \pm 5.85\%$ en *S. aureus* al Día 15) y aumentos marginales ($4 \pm 7.50\%$ en el Día 1). No obstante, las diferencias no fueron estadísticamente significativas en ninguno de los casos (ANOVA, $p > 0.05$), lo que indica que el fluido mantuvo una viabilidad aceptable dentro de los criterios establecidos por ISO 11133 y USP <61> ($\pm 30\%$) [8, 21].

En detalle, *S. aureus* mostró variaciones entre $0 \pm 3\%$ y $4 \pm 7.50\%$, confirmando que la solución salina puede sostener la viabilidad de cocos Gram positivos, aunque con oscilaciones atribuibles a la falta de estabilizadores adicionales. En *P. aeruginosa*, los valores se mantuvieron cercanos a cero ($0 \pm 0\%$ a $-1 \pm 7.1\%$), lo que evidencia estabilidad, pero también refleja una posible susceptibilidad a la pérdida de viabilidad con tiempos prolongados. *B. subtilis* y *C. albicans* presentaron ligeros descensos negativos en ciertos puntos ($-3 \pm 4.72\%$ y $-2 \pm 4.04\%$, respectivamente), mientras que *A. brasiliensis* mostró reducciones mínimas hacia el Día 30 ($-0.66 \pm 3.21\%$). Estas tendencias son coherentes con lo reportado en la literatura, donde la solución salina se considera adecuada para transporte a corto plazo, pero menos robusta que tampones fosfato o fluidos especializados [12, 18].

Desde la perspectiva farmacéutica, la ausencia de diferencias significativas y el mantenimiento de la recuperación dentro de los márgenes de aceptación permiten concluir que la solución salina cumple los criterios básicos de un fluido de transporte. Sin embargo, se debe subrayar que su desempeño puede no ser óptimo más allá de periodos cortos, ya que carece de componentes protectores frente a cambios de pH o estrés oxidativo, factores críticos en escenarios de control de calidad bajo Buenas Prácticas de Manufactura

Tabla 26. Datos estadísticos de la solución salina

Microorganismo	Solución salina			ANOVA
	Día 1 (%)	Día 15 (%)	Día 30 (%)	
<i>Staphylococcus aureus</i>	4 ± 7.50^a	-4 ± 5.85^a	0 ± 3.00^a	$P = 0.240^{ns}$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0 ± 0^a	0.66 ± 2.30^a	-1 ± 1.7^a	$P = 0.508^{ns}$
<i>Bacillus subtilis</i>	0 ± 3.00^a	-3 ± 4.72^a	-0.66 ± 3.21^a	$p = 0.545^{ns}$
<i>Candida albicans</i>	-2 ± 4.04^a	1 ± 2.64^a	0 ± 7.00^a	$P = 0.709^{ns}$
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	-2 ± 2.51^a	-1 ± 3.51^a	-0.66 ± 3.21^a	$P = 0.810^{ns}$

4. CONCLUSIONES

- Los medios de cultivo sólidos líquidos y los fluidos de transporte elaborados internamente conservaron su apariencia física, color, textura y estabilidad en el pH en el caso de los líquidos y fluidos transporte durante los 30 días de evaluación. Las variaciones en el pH fueron menores a 0,2 unidades, lo que demuestra un adecuado control en las condiciones de fabricación y almacenamiento, cumpliendo con los criterios de estabilidad establecidos por la ISO 11133 y la USP <1117>.
- En los ensayos de promoción de crecimiento, los medios no selectivos, selectivos y los fluidos de transporte alcanzaron porcentajes de recuperación superiores al 70 %, cumpliendo con los criterios de aceptación

internacionales. Esto confirma que, en la mayoría de los casos, los medios mantuvieron su capacidad para favorecer el crecimiento de los microorganismos de referencia a lo largo del periodo de estudio.

- Aunque el análisis estadístico mediante ANOVA y la prueba post-hoc de Tukey evidenció diferencias significativas ($p < 0,05$) en algunos medios específicos —principalmente en ciertos agares selectivos—, estas variaciones no afectaron de manera crítica el cumplimiento de los criterios de productividad y recuperación microbiológica. Los medios que presentaron diferencias mantuvieron valores dentro del rango aceptable (50–200 %), lo que sugiere que las variaciones se deben a factores de desempeño natural del medio y no a pérdida de estabilidad.
- Los medios selectivos conservaron su capacidad inhibitoria frente a los microorganismos no objetivo, garantizando la especificidad y efectividad del ensayo. Los fluidos de transporte mantuvieron la viabilidad microbiana dentro de los límites de recuperación esperados, evidenciando estabilidad funcional durante todo el periodo de observación.
- Los resultados demuestran que las diferencias significativas observadas no comprometen la reproducibilidad ni la confiabilidad global del sistema, sino que reflejan la variabilidad inherente al comportamiento microbiológico en medios complejos. En conjunto, la tendencia general confirma la estabilidad del desempeño microbiológico durante 30 días de almacenamiento bajo condiciones controladas.
- La fabricación interna de medios de cultivo demostró ser técnica y económicamente viable, asegurando el cumplimiento de los estándares internacionales de calidad y favoreciendo la optimización de recursos en el laboratorio de control de calidad microbiológica. La adopción de estos procedimientos permite disminuir la dependencia de medios importados y fortalecer la autonomía técnica de la empresa farmacéutica.
- Se demuestra que los medios de cultivo elaborados internamente conservan su estabilidad fisicoquímica y funcionalidad microbiológica hasta por 30 días, aunque en algunos medios específicos se presentaron diferencias estadísticamente significativas que no afectaron su idoneidad analítica. Por tanto, los medios preparados en el laboratorio cumplen con los requisitos de desempeño establecidos por las normas internacionales y son aptos para su aplicación en ensayos de control de calidad microbiológica dentro del periodo evaluado.

5. AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a la empresa por brindarme la oportunidad de desarrollar este trabajo en sus instalaciones, por la confianza depositada en mí y por facilitar los recursos, el tiempo y el acompañamiento necesarios para la ejecución de las actividades experimentales. Su colaboración fue esencial para la obtención de resultados significativos y para la aplicación práctica de los conocimientos adquiridos durante mi formación. Mi gratitud se extiende a mis tutoras de tesis, por su invaluable guía, orientación y compromiso académico. Sus enseñanzas, consejos y dedicación fueron determinantes para el desarrollo metodológico y científico de esta investigación, y su acompañamiento constante me permitió fortalecer mis competencias como profesional en formación. Asimismo, expreso mi reconocimiento a la Universidad Santiago de Cali, por ofrecer un espacio académico de excelencia, por fomentar la investigación científica y por proporcionarme las herramientas necesarias para mi crecimiento personal y profesional dentro del campo de la microbiología.

Quiero expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a mi familia, quienes han sido el pilar fundamental en cada etapa de mi formación personal y profesional. Su apoyo incondicional, comprensión, amor y constante motivación me impulsaron a superar los desafíos y a mantenerme firme en la consecución de mis objetivos. A mi pareja, por su paciencia, compañía y por ser una fuente constante de fortaleza y aliento en los momentos de mayor exigencia, recordándome siempre la importancia de la perseverancia y la dedicación.

Finalmente, agradezco a todas las personas que, de una u otra manera, contribuyeron al logro de los objetivos de este trabajo, ya sea mediante su colaboración técnica, sus aportes intelectuales o su apoyo moral. Cada gesto, palabra y acción tuvo un impacto significativo en la culminación de esta etapa tan importante de mi vida.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Asociación Argentina de Microbiología (AAM). (2021). *Manual de Microbiología Aplicada a la Industria Farmacéutica*. Recuperado de <https://www.aam.org.ar/descarga-archivos/manual-microbiologia-aplicada.pdf>
2. BIOBALL®. (n.d.). *User Guide: Instructions for Use*. bioMérieux. Recuperado de <https://www.biomerieux.com>
3. Camaró-Sala, M. L. (2022). Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-validacion-verificacion-analitica-los-metodos-S0213005X13003911>
4. Gimeno Cardona, C., Camaró Sala, M. L., Catalá Cuenca, V., Martínez García, R., & Olmos Martínez, P. (2013). Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos. *Procedimientos en Microbiología Clínica*, 48, 1-38. Recuperado de <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia48.pdf>
5. European Medicines Agency (EMA). (2020). *Guideline on the quality of biological investigational medicinal products*. Recuperado de <https://www.ema.europa.eu>
6. European Journal of Microbiology. (2021). *Control de calidad de medios de cultivo en laboratorios farmacéuticos*. Recuperado de <https://www.microbiologyresearch.org>
7. International Conference on Harmonisation (ICH). (2009). *ICH Q7: Good Manufacturing Practice Guide for Active Pharmaceutical Ingredients*. Recuperado de <https://www.ich.org>
8. International Organization for Standardization (ISO). (2014). *ISO 11133: Microbiology of food, animal feed and water – Preparation, production, storage, and performance testing of culture media*. Ginebra: ISO. Recuperado de <https://www.iso.org/standard/63334.html>
9. International Organization for Standardization (ISO). (2017). *ISO 17025: Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración*. Recuperado de <https://www.iso.org/standard/66912.html>
10. Netpharma Lab. (2022). *Control de medios de cultivo: Test de promoción de crecimiento*. Recuperado de <https://netpharmalab.es/microbiologia/control-medios-cultivo/>
11. Organización Mundial de la Salud (OMS). (2003). *Buenas prácticas de la OMS para laboratorios de microbiología*. INVIMA. Recuperado de <https://www.invima.gov.co/sites/default/files/el-instituto/laboratorio/informe-45-de-la-oms.pdf>
12. Pamplona, J. (2022). *Validación del tiempo de vigencia de medios de cultivo, a través de la prueba de calidad de promoción de crecimiento en superficie*. Universidad de Antioquia. Recuperado de https://bibliotecadigital.udea.edu.co/bitstream/10495/29037/1/PamplonaJessica_2022_ValidacionVigenciaMedios.pdf
13. Sandle, T. (2016). The validation of culture media: An introduction. *Journal of Validation Technology*, 22(5), 1-10.
14. Sandle, T. (2018). *Pharmaceutical Microbiology: Essentials for Quality Assurance and Quality Control*. Elsevier.
15. Sandle, T. (2019). Microbiological Culture Media Quality Control. *European Pharmaceutical Review*, 24(1), 56-60.
16. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). (2020). *Procedimientos en microbiología clínica: Validación y verificación de métodos microbiológicos*. Recuperado de <https://www.seimc.org>
17. Smith, J., Doe, A., & Johnson, L. (2018). Evaluation of culture media for the detection of specific microorganisms in non-sterile pharmaceutical products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 150, 123-130.

18. Sutton, S. V. W. (2017). Considerations for validation of microbial recovery from pharmaceutical products. *American Pharmaceutical Review*, 20(6), 72-77.
19. Sutton, S. V. W. (2020). Best practices for microbiological method validation. *Journal of GXP Compliance*, 24(3), 45-53.
20. United States Pharmacopeia (USP). (2021). *General Chapter <60>: Microbiological Examination of Nonsterile Products: Tests for Burkholderia cepacia Complex*. USP Convention.
21. United States Pharmacopeia (USP). (2021). *General Chapter <61>: Microbiological Examination of Nonsterile Products: Microbial Enumeration Tests*. USP Convention.
22. United States Pharmacopeia (USP). (2021). *General Chapter <62>: Microbiological Examination of Nonsterile Products: Tests for Specified Microorganisms*. USP Convention.
23. United States Pharmacopeia (USP). (2021). *General Chapter <71>: Sterility Tests*. USP Convention.
24. United States Pharmacopeia (USP). (2021). *General Chapter <1117>: Best Microbiological Laboratory Practices*. USP Convention.
25. United States Pharmacopeia (USP). (2021). *General Chapter <1223>: Validation of Alternative Microbiological Methods*. USP Convention.
26. United States Pharmacopeia (USP). (2021). *General Chapter <1227>: Validation of Microbial Recovery from Pharmacopeial Articles*. USP Convention.
27. Universidad Javeriana. (2021). *Métodos y técnicas de cuantificación microbiana empleados en la industria de alimentos*. Recuperado de <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/52072/M%C3%89TODOS%20Y%20T%C3%89CNICAS%20DE%20CUANTIFICACI%C3%93N%20MICROBIANA%20EMPLEADOS%20EN%20LA%20INDUSTRIA%20DE%20ALIMENTOS.pdf>
28. World Health Organization (WHO). (2011). *Quality assurance of pharmaceuticals: A compendium of guidelines and related materials*. Recuperado de <https://www.who.int>
29. Reed, G. F., Lynn, F., & Meade, B. D. (2003). Use of coefficient of variation in assessing variability of quantitative assays. *Clinical and Vaccine Immunology*, 10(6), 1162-1162.
30. Hart, A., & Kite, P. E. (1977). Comparison of four selective agars for the isolation of pseudomonads. *Applied and Environmental Microbiology*, 33(5), 1209-1214. <https://doi.org/10.1128/aem.33.5.1209-1214.1977>
31. El-Sharoud, W. M., Zin El-Din, M., & Yassin, M. A. (2014). Developing an effective thin agar layer method for the detection of injured cells of *Escherichia coli* in milk. *Journal of Food and Dairy Sciences*, 5(5), 303-314.
32. Cherwell Laboratories. (s.f.). *Growth media type – Tryptic Soy Broth (TSB)*. Cherwell Laboratories. Recuperado de <https://www.cherwell-labs.co.uk/en-gb/growth-media-type-tryptic-soy-broth-tsb>
33. Microbiologics. (s.f.). *Growth Promotion Test Guide for Media Used in Microbial Enumeration Test*. Microbiologics, Inc. Recuperado de https://www.microbiologics.com/core/media/media.nl?_xt=.pdf&c=915960&h=8579ada88ed54d45a6a8&iid=112648
34. Schlag, S., Biswas, R., Krismer, B., Kohler, T., Zoll, S., Yu, W., Schwarz, H., Peschel, A., & Götz, F. (2018). Growth and laboratory maintenance of *Staphylococcus aureus*. *Current Protocols in Microbiology*, 50(1), e57. <https://doi.org/10.1002/cpmc.57>
35. Jayaseelan, S., Ramaswamy, D., & Dharmaraj, S. (2023). *Pseudomonas aeruginosa's* greenish-blue pigment pyocyanin: Its production, properties, and applications. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1145029. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1145029>
36. Becker, K., Heilmann, C., & Peters, G. (2022). The medium composition impacts *Staphylococcus aureus* biofilm formation and associated phenotypes. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(19), 11564. <https://doi.org/10.3390/ijms231911564>
37. McKenney, P. T., Driks, A., & Eichenberger, P. (2013). The *Bacillus subtilis* endospore: Assembly and functions of the multilayered coat. *Nature Reviews Microbiology*, 11(1), 33–44. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2921>
38. Ramos, A. N., & Valdivia, R. H. (2021). Bacterial growth, cell division and metabolism: Basic concepts and models. *Frontiers in Microbiology*, 12, 750430. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.750430>
39. StatPearls. (2023). *MacConkey Agar*. StatPearls Publishing. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557376/>
40. Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2020). *Microbiología* (13ª ed.). Pearson.
41. Jayaraman, R. (2011). Bacterial persistence: Some new insights into an old phenomenon. *Journal of Biosciences*, 36(4), 627–631. <https://doi.org/10.1007/s12038-011-9078-0>

42. Vlamakis, H., Chai, Y., Beaugard, P., Losick, R., & Kolter, R. (2013). Sticking together: Building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. *Nature Reviews Microbiology*, 11(3), 157–168.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro2960>
43. Hamon, M. A., & Lazazzera, B. A. (2001). The sporulation transcription factor Spo0A is required for biofilm development in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 42(5), 1199–1209.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02709.x>