

Productividad y selectividad del medio de cultivo a partir de guayaba agria (*Psidium araca*) en el crecimiento de levaduras nativas del género *Candida* sp.

Sour guava (*Psidium araca*) culture medium productivity and selectivity regarding native yeast *Candida* sp growth.

Cecilia Lara Mantilla¹, Carmelo A. Mendoza F², Luis E. Oviedo Zumaqu³

Resumen

El presente trabajo se llevó a cabo para evaluar la eficiencia del medio de cultivo a partir de guayaba agria (*Psidium araca*) frente a medios comerciales en el crecimiento de tres cepas nativas: *Candida guilliermondii*, *Candida famata* y *Candida* sp. Se evaluó el crecimiento microbiano a diferentes concentraciones de fruta, 5, 10, 25 y 50% p/v, tomando como control los medios comerciales: Malta, Sabouraud y agar papa dextrosa (PDA). La productividad y selectividad del medio de guayaba agria fue determinada mediante el método Ecométrico en un tiempo de 48 horas. Los análisis estadísticos aplicados para evaluar y comparar el crecimiento de las cepas en los medios comerciales y en el medio de guayaba agria a diferentes concentraciones demostraron lo siguiente: *Candida guilliermondii* presentó crecimiento mayor o igual a 25 y 50% p/v comparado con los medios comerciales; *Candida famata* y *Candida* sp presentaron mejores crecimientos al 5% p/v, con respecto a los diferentes medios comerciales. Los resultados demostraron que el medio de cultivo es altamente productivo y no selectivo, lo que representa una alternativa en la conservación, el mantenimiento y el desarrollo de las levaduras estudiadas.

Palabras clave: método Ecométrico, *Candida guilliermondii*, *Candida famata* y *Candida* sp.

Abstract

This work was aimed at comparing the efficiency of sour guava (*Psidium araca*) culture medium to commercial media regarding the growth of three native strains: *Candida guilliermondii*, *Candida famata* and *Candida* sp. Microbial growth was evaluated in different fruit concentrations: 5%, 10%, 25% and 50% w/v; Malta, Sabouraud and potato dextrose agar (PDA) commercial media were used as control. Sour guava medium productivity and selectivity were determined by the ecometric method over a 48 hour period. Statistical analysis

1 Ph. D. Directora e investigadora Grubiodeq. Directora Proyecto y Tesis Maestría en Biotecnología. Universidad de Córdoba. Colombia. lara_mantilla_cecilia@hotmail.com; clara@sinu.unicordoba.edu.co

2 M. Sc. en Biotecnología, Universidad de Córdoba. Investigador Grubiodeq.

3 M. Sc. Investigador Grubiodeq. luisoviedo59@hotmail.com

for evaluating and comparing the strains' growth in commercial culture medium and in sour guava medium at different concentrations revealed that *Candida guilliermondii* grew greater than or equal to 25% and 50% w/v compared to *Candida famata* commercial medium and that *Candida* sp showed better growth at 5% w/v regarding commercial medium. The results showed that the medium was highly productive and non-selective, representing an alternative for yeast conservation, maintenance and development.

Key words: Ecometric method, *Candida guilliermondii*, *Candida famata* and *Candida* sp.

Recibido: marzo 25 de 2010

Aprobado: noviembre 3 de 2010

Introducción

El material nutritivo preparado para el crecimiento de microorganismos se denomina medio de cultivo (Funke, 2007). Para el caso de las levaduras, se encuentran en el mercado medios de cultivo comerciales comúnmente utilizados, tales como: extracto de malta (agar, caldo), Sabouraud, agar papa dextrosa (PDA), oxitetraciclina-glucosa-extracto de levadura (OGY) entre otros, destacándose el medio malta por su alto contenido de carbohidratos; sin embargo, los elevados costos de estas formulaciones, los cuales oscilan entre \$1.000.000 y \$1.400.000 (Merck, 2007-2008), han llevado a la realización de investigaciones sobre la evaluación y el uso de sustratos más económicos tales como melaza de azúcar de caña, banano, arroz, papa, camote y otros, obteniéndose buenos resultados y planteándose la posibilidad de ser utilizados como alternativas viables para el desarrollo, crecimiento y mantenimiento de microorganismos con fines industriales.

La guayaba agria (*Psidium araca*) ha sido estudiada como sustrato para la elaboración de medios de cultivo, encontrándose que puede ser utilizada para el crecimiento, mantenimiento y la conservación de bacterias (cocos y bacilos) y levaduras de origen ruminal y del estiércol (Lara y Chalela, 2002). Una comparación de la biomasa del crecimiento de los microorganismos ruminales y del estiércol, realizada en el medio de guayaba al 25 % p/v y en un medio tradicional empleando contenido ruminal

clarificado, demostró que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los dos medios; por tanto, los medios son semejantes y los nutrientes apropiadas para la población estudiada excluyéndose a las especies estrictamente celulolíticas (Lara, 2005); el estudio químico de los componentes encontrados en el medio de cultivo a partir del jugo de guayaba agria reveló que es un medio alternativo para el aislamiento y mantenimiento de la microbiota aislada porque aporta los valores nutricionales requeridos por esas poblaciones microbianas (Lara, 2008a; Lara, 2008b).

La guayaba agria es una fruta de gran producción en el departamento de Córdoba, Colombia, y proviene de un cultivo de cosecha permanente en la región. El cultivo de la fruta se ha venido incrementando, lo cual ha servido de sustento para muchas familias campesinas en los últimos tiempos; sin embargo, el poco asesoramiento tecnológico que los cultivadores tienen, trae como consecuencia la disminución de la rentabilidad, acrecentado con el individualismo en la comercialización. Esta fruta tiene una producción de 1.200 t/año, establecida en los municipios de Montería y Cereté, donde el consumo de la fruta mayoritariamente es en fresco por los habitantes de la comunidad y su valor oscila alrededor de \$2.000/kg (Gobernación de Córdoba, 2005).

Basados en los resultados previos obtenidos sobre el uso de guayaba agria como medio de cultivo, se hace necesario establecer si este

es apropiado para el crecimiento de las poblaciones microbianas; en este sentido, la evaluación ecométrica (Lighfood y Maier, 2002; Mossel *et al.*, 1983) es uno de los métodos recomendados para el monitoreo de medios de cultivo, que evalúa tanto la sensibilidad de los medios a la colonización por los microorganismos buscados (productividad) como también la resistencia a la colonización por las cepas que interfieren (selectividad) (Villalobos *et al.*, 2007). El análisis ecométrico establece la eficiencia con la cual un medio de cultivo sirve para recuperar una cepa o, mejor aún, inducir su crecimiento y desarrollo mediante la comparación que se realiza entre el medio por evaluar y un medio control (Soler, 2006). Un parámetro útil para interpretar los resultados es el índice de crecimiento absoluto (ICA) que determina el grado de selectividad y productividad del medio según el caso; otro parámetro es el índice de crecimiento relativo (ICR) que relaciona los valores de ICA del medio por evaluar con el ICA del medio control, y determina la capacidad que tiene el medio de prueba de recuperar la microbiota de una muestra determinada, frente a un medio nutritivo como lo es el de control (Mossel *et al.*, 1983).

El objetivo de la presente investigación fue evaluar la eficiencia de un medio de cultivo a partir de guayaba agria frente a medios comerciales, en el crecimiento de tres cepas nativas: *Candida guilliermondii*, *Candida famata* y *Candida sp.*

Materiales y métodos

Microorganismos utilizados. Cepas nativas del género *Candida*: *Candida guilliermondii*, *Candida famata* y *Candida sp* pertenecientes al banco de cepas del laboratorio Grubiodeq (Universidad de Córdoba, Montería, Colombia).

Medios de cultivos. Se prepararon medios de cultivo líquidos y sólidos a partir de la guayaba agria (MG) a diferentes concentraciones: 5, 10, 25, 50% p/v, ajustando el pH a 5,6 (Lara, 2005). Los medios comerciales emplea-

dos fueron: extracto de Malta (AGAR, caldo), Sabouraud (AGAR, caldo) y agar papa dextrosa PDA (AGAR, caldo).

Evaluación del crecimiento. Las levaduras fueron evaluadas en su crecimiento mediante observación macroscópica (forma, elevación, borde, superficie, color), y microscópica con tinciones específicas y conteo de células viables por el método de las diluciones seriadas (Aqui-huatl y Pérez, 2004).

Determinación de la selectividad y productividad del medio guayaba agria. Para determinar la selectividad y productividad del medio guayaba agria, se utilizó el método ecométrico (Mossel *et al.*, 1983). Este método consiste en realizar una siembra en estrías en una placa del medio que se va a evaluar, a partir de una suspensión de un microorganismo de prueba. Antes de verter el medio en la placa de Petri, esta se dividió en cuatro cuadrantes en la base y en cada cuadrante se trazaron cinco líneas paralelas y una línea en el centro (Cabeza, 2001). Luego se realizó la inoculación de las levaduras de prueba (*Candida guilliermondii*, *Candida famata* y *Candida sp*) y el microorganismo interferente (*Escherichia coli*) previamente crecidos en un medio de cultivo. Posteriormente, se tomó el medio agar guayaba agria para evaluar los microorganismos de prueba y al microorganismo interferente (en el mismo medio de cultivo) y como control se sembraron los microorganismos de prueba en medios comerciales, para verificar su crecimiento (Lightfoot y Maier, 2002). En la prueba se considera válida cualquier estría que crezca más del 25% de la línea; cada estría tiene un valor de 0,2 y la estría central un valor de 1, es decir, que el crecimiento máximo que se puede presentar es de 5 ($0,2 \times 20 + 1$) = 5, por lo que se debe multiplicar el número de estrías que presentaron crecimiento por 0,2 y sumar 1 en caso de que se haya presentado crecimiento en la estría central, obteniendo así el índice de crecimiento absoluto (ICA). El ICA permite clasificar a los medios de cultivo: ICA = 4,5 - 5, medios altamente productivos; ICA = 2,5 - 4,5, medios medianamente productivos; ICA < 2,5, medios poco productivos; ICA = 0,

medios no productivos. El ICA resultante del interferente evalúa la selectividad, por lo que a mayor selectividad, menor será el ICA: ICA = 0, medios altamente selectivos; ICA = 0 - 2,5, medios medianamente selectivos; ICA > 2,5, medios no selectivos. Se debe llevar a cabo un control en un medio nutritivo o enriquecido para determinar que el microorganismo en estudio no tiene ningún problema para crecer. Cabe anotar que el ICA obtenido en la caja de control debe ser muy similar al ICA de la caja de medio de prueba, lo cual quiere decir que el microorganismo de prueba no presenta ningún problema de crecimiento y la cepa resulta viable para el estudio, dándole así validez a la prueba. El ICR se obtiene de la división del ICA de prueba / ICA control, y al ser crecimientos similares el valor debe estar por encima de 0,95 - 1, es decir, la prueba tiene validez si existe por lo menos un crecimiento de un 95 - 100% (Padilla, 2007).

Se realizaron tres repeticiones del método ecométrico para evaluar los medios de cultivo.

Análisis estadístico. Se realizó análisis de varianza Anova para evaluar el crecimiento de las cepas en el medio de guayaba a diferentes concentraciones y en el medio comercial (nivel de significancia $p < 0,05$). Los análisis fueron obtenidos por el empleo del software R versión 2.10.1, publicado el 14 de diciembre de 2009.

Resultados y discusión

Crecimiento microbiano a diferentes concentraciones de guayaba agria

Las tablas 1, 2 y 3 presentan los resultados de crecimiento de las cepas, en unidades formadoras de colonias, a concentraciones de guayaba agria: 5, 10, 25 y 50% p/v, y tomando como control cada uno de los medios comerciales PDA, Malta y Sabouraud (significancia $p < 0,05$) (Lara y Mendoza, 2010).

La cepa *Candida guilliermondii* muestra diferencias significativas de su crecimiento en el medio MG 50% (a) con respecto a los medios PDA, MG 25%, MG 10% y MG 5% (b); para las levaduras *Candida famata* y *Candida sp*, el crecimiento en medio PDA y en los demás medios evaluados a diferentes concentraciones de la fruta, fue semejante. Los resultados sugieren que el aporte nutricional del MG es semejante al aportado por el medio comercial PDA.

Para la cepa *Candida guilliermondii* los resultados denotaron que el mayor crecimiento de la levadura se dio a una concentración de MG 50% (a), un menor crecimiento en MG 10% y MG 5% (b), y por último, un crecimiento intermedio (ab) conformado por el medio comercial Malta y MG 25%; para las levaduras *Candida famata* y *Candida sp*, se observaron resultados semejantes a los obtenidos utilizando el medio PDA.

Tabla 1. Crecimiento de levaduras a las 48 horas en medios de guayaba agria y PDA (valores promedio)

Levadura	MG 5%	MG 10%	MG 25%	MG 50%	PDA	Anova (p valor)
<i>Candida guilliermondii</i>	b 5,40 x 10 ⁸	b 7,80 x 10 ⁸	b 1,03 x 10 ⁹	a 2,86 x 10 ⁹	b 5,61 x 10 ⁸	0,0028
<i>Candida famata</i>	2,1 x 10 ⁹	2,06 x 10 ⁹	1,09 x 10 ⁹	1,96 x 10 ⁹	2,1 x 10 ⁹	0,6178
<i>Candida sp</i>	3,01 x 10 ⁹	2,41 x 10 ⁹	2,66 x 10 ⁹	1,90 x 10 ⁹	6,31 x 10 ⁹	0,8760

Letras iguales no presentan diferencias significativas.
Letras diferentes presentan significancia.

Tabla 2. Crecimiento de levaduras a las 48 horas en medios de guayaba agria y Malta (valores promedio)

Levadura	MG 5%	MG 10%	MG 25%	MG 50%	Malta	Anova (p valor)
<i>Candida guilliermondii</i>	b 5,40 x 10 ⁸	b 7,80 x 10 ⁸	ab 1,03 x 10 ⁹	a 2,86 x 10 ⁹	ab 2,06 x 10 ⁹	0,0117
<i>Candida famata</i>	2,10 x 10 ⁹	2,06 x 10 ⁹	1,09 x 10 ⁹	1,96 x 10 ⁹	1,12 x 10 ⁹	0,7502
<i>Candida sp</i>	3,01 x 10 ⁹	2,41 x 10 ⁹	2,66 x 10 ⁹	1,90 x 10 ⁹	4, 56 x 10 ⁹	0,8650

Letras iguales no presentan diferencias significativas.

Letras diferentes presentan significancia.

Tabla 3. Crecimiento de levaduras a las 48 horas en medios de guayaba agria y Sabouraud (valores promedio)

Levadura	MG 5%	MG 10%	MG 25%	MG 50%	Sabouraud	Anova (p valor)
<i>Candida guilliermondii</i>	b 5,40 x 10 ⁸	b 7,80 x 10 ⁸	ab 1,03 x 10 ⁹	a 2,86 x 10 ⁹	ab 1, 32 x 10 ⁹	0,0177
<i>Candida famata</i>	2,10 x 10 ⁹	2,06 x 10 ⁹	1,09 x 10 ⁹	1,96 x 10 ⁹	3,67 x 10 ⁹	0,8068
<i>Candida sp</i>	3,01 x 10 ⁹	2,41 x 10 ⁹	2,66 x 10 ⁹	1,90 x 10 ⁹	2,96 x 10 ⁹	0,3451

Letras iguales no presentan diferencias significativas.

Letras diferentes presentan significancia.

Para la cepa *Candida guilliermondii* los resultados muestran un crecimiento significativo en MG 50% (a) con respecto al medio comercial Sabouraud y a los demás medios evaluados de MG; para el caso de las levaduras *Candida famata* y *Candida sp*, no se evidenciaron diferencias en el crecimiento, al ser comparadas con el medio comercial Sabouraud y los demás medios a diferentes concentraciones de la fruta.

De las tablas 1, 2 y 3 se puede deducir que el medio de guayaba agria aporta en forma natural requerimientos nutricionales necesarios y en proporciones adecuadas para las levaduras estudiadas, de tal forma que la composición del medio de guayaba asemeja el valor nutricional de los medios comerciales PDA, Malta

y Sabouraud. La guayaba agria puede constituir un sustrato adecuado para los microorganismos debido al potencial nutritivo que posee en cuanto a proteína y azúcares totales; así como nutrientes como vitamina C y los elementos potasio, sodio, hierro, fosforo y calcio (Lara *et al.*, 2007; Lara, 2008a).

Selectividad y productividad del medio guayaba agria mediante el ensayo Ecométrico

Las tablas 4, 5 y 6 reflejan los resultados de productividad y selectividad del medio de cultivo guayaba agria con respecto a las diferentes cepas (Lara y Mendoza, 2010).

Según los resultados obtenidos en el método ecométrico usando *Candida guillermundii* se encontró que el medio de cultivo MG 25% p/v, es un medio altamente productivo debido a que presentó un ICA de 4,8. Sin embargo, es un medio no selectivo debido a que presentó un ICA de interferencia de 4,6, lo cual quiere

decir que no se presentó inhibición del microorganismo interferente. De otro lado, el valor de ICR fue de 1, lo que demuestra la capacidad que tiene este medio de recuperar los microorganismos y que el microorganismo de prueba no presenta ningún problema de crecimiento.

Tabla 4. Método ecométrico del medio de cultivo guayaba agria al 25 % p/v con *Candida guillermundii*

Medio de cultivo		Microorganismo	ICA	ICR
Ecométrico	Medio de cultivo			
Prueba	MGa 25%	<i>Candida guillermundii</i>	4,8	1
Interferente	MGa 25%	<i>Escherichia coli</i>	4,6	
Control	Malta	<i>Candida guillermundii</i>	4,8	

Tabla 5. Método ecométrico del medio de cultivo guayaba agria al 5 % p/v con *Candida famata*

Medio de cultivo		Microorganismo	ICA	ICR
Ecométrico	Medio de cultivo			
Prueba	MGa 5%	<i>Candida famata</i>	4,6	0,96
Interferente	MGa 5%	<i>Escherichia coli</i>	4,8	
Control	Malta	<i>Candida famata</i>	4,8	

Tabla 6. Método ecométrico del medio de cultivo guayaba agria al 5 % p/v con *Candida sp*

Medio de cultivo		Microorganismo	ICA	ICR
Ecométrico	Medio de cultivo			
Prueba	MGa 5%	<i>Candida sp</i>	4,6	0,96
Interferente	MGa 5%	<i>Escherichia coli</i>	4,8	
Control	Malta	<i>Candida sp</i>	4,8	

El medio de cultivo MG 5% p/v utilizando *Candida famata* y *Candida sp* demostró, en ambos casos, ser altamente productivo (ICA = 4,6) y no selectivo (ICA de interferencia = 4,8), es decir, no hubo inhibición del microorganismo interferente. Por otra parte, el valor obtenido del ICR (0,96) indica la capacidad que tiene el medio de guayaba agria para recuperar la microbiota y la viabilidad de los microorganismos estudiados.

De acuerdo con los resultados obtenidos en la investigación, el MG se presenta como un medio eficiente para la nutrición de las levaduras usadas en este trabajo; la caracterización química realizada por Lara (2008 a) al medio de cultivo a partir de guayaba agria al 25 % p/v, luego de ser esterilizado, mostró los siguientes valores: 0,27% de proteína, 1,00% de azúcares totales, 0,59% de azúcares reductores, 0,41 % de azúcares no reductores, 59,0% de azúcares invertidos; elementos presentes: 9,8 mg/kg de Fe, 52,64 mg/kg de Ca, 22,12 mg/kg de Mg, 14,93 mg/kg de Na y 323,12 mg/kg de K. Teniendo en cuenta el análisis químico, se observa que el medio posee en forma natural fuente de nitrógeno (proteínas), fuente de energía (carbohidratos) y factores de crecimiento (elementos presentes), al igual que los medios comerciales. Realizando una comparación se sugiere que, mientras los medios de cultivo comerciales se basan en formulaciones químicas definidas, el medio de guayaba, siendo natural, contiene los nutrientes en concentraciones suficientes que permiten buen desarrollo y crecimiento a las levaduras estudiadas.

La guayaba agria se considera como sustrato económicamente sostenible para la elaboración de medios de cultivo capaces de competir con medios de cultivo tradicionales comerciales; de ahí la importancia del presente trabajo de investigación. Representa un incentivo al sector productivo de la fruta, debido a que ésta es subutilizada, pues los habitantes la consumen en jugos fresco y jaleas. Un mejor aprovechamiento de la guayaba agria para el sector productivo en el departamento de Córdoba puede ser la implementación de procesos

industriales a partir de esta fruta, relacionados con otro tipo de productos; la fruta representa una buena opción para sustituir medios de cultivo comerciales altamente costosos.

Se abre un camino hacia una nueva aplicación de la guayaba agria pudiéndose convertir en una alternativa importante en cuanto a un mejor aprovechamiento de estrategias de sostenimiento de un recurso propio para la agricultura cordobesa; a futuro se pretende la consecución de resultados en cuanto al desarrollo de procesos tales como: aumento en la producción y comercialización de la guayaba agria, industrialización de la cadena frutícola en la región, generación de empleos directos e indirectos, producción de un medio de cultivo microbiano a bajo costo y disminución de contaminación ambiental por la descomposición de la fruta desaprovechada. Esto sin descartar otros tipos de productos industriales a partir de procesos biotecnológicos que lleven al crecimiento y desarrollo de la región.

Conclusiones

El medio de cultivo a partir de guayaba agria representa una opción viable con respecto a los medios de cultivo comerciales, por su bajo costo y buen aporte de nutrientes para las levaduras estudiadas.

Los resultados encontrados permiten dar un nuevo uso a la fruta pudiendo permitir una mayor productividad y rentabilidad para la comunidad cordobesa.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Universidad de Córdoba y a la Gobernación de Córdoba por la financiación de parte del presente proyecto.

Referencias bibliográficas

- Aquihuatl, R. M. y Pérez, C. M. 2004. *Manual de prácticas de laboratorio de microbiología general*. 1 edición. Mexico: Universidad Autónoma Metropolitana.

- Cabeza, H. E.A. 2001. Manual práctico de microbiología de alimentos. Madrid: Acribia.
- Gobernacion de Córdoba. 2005. Secretaría de Desarrollo Económico y Agroindustrial. Documento Excel: Evaluaciones agropecuarias 2001-2005, Dpto. de Córdoba.
- Lara, M. C. y Chalela A. 2002. Nuevo medio de cultivo para el aislamiento de microorganismos ruminales. *Arch. Zootecnia*, 51 (195): 404-404.
- Lara, M. C. 2005. Evaluación de biomasa ruminal en el medio de guayaba agria. *Arch. De Zootecnia*. 54(205):109-112.
- Lara, M. C. 2008a. Análisis químico del medio Psidium araca al 25 % p/v. *Rev. Archivos de Zootecnia*, 57 (217): 79-82.
- Lara, M. C. 2008b. Composición química de un medio de cultivo a partir de guayaba agria (*Psidium araca*) y su relación con la nutrición de los microorganismos ruminales. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 10 (2): 44-49.
- Lara, M. C., Nerio, L. S. y Oviedo, L. E. 2007. Evaluación fisicoquímica y bromatológica de la guayaba agria (*Psidium araca*.) en dos estados de maduración. *Temas Agrarios*, 12 (1): 13-21.
- Lara, M. C. y Mendoza, C. A. 2010. Evaluación de la productividad y selectividad de un medio de cultivo a partir de guayaba agria (*Psidium araca*) en el crecimiento de las cepas nativas del género *Candida sp*. Tesis de Maestría en Biotecnología. Depto de Química. Universidad de Córdoba, Córdoba, Colombia, p. 78.
- Lightfood, N. F. y Maier, E. A. 2002. *Análisis microbiológico de alimentos y aguas. Directrices para el aseguramiento de la calidad*. Zaragoza: Aribia.
- Merck. 2007-2008. Casa Comercial. Catálogo, *Manual de Microbiología*.
- Mosselt, D. A. A., Rees, M. G., Bonants- V AN laarhoven, A., Ligtenberg-Merk, T. H. y Werdle, M. 1983. Quality assurance of selective culture media for bacteria, moulds and yeasts: an attempt at standardization at the international level. *Journal of Applied Bacterioiogy*, 54: 313-327.
- Padilla, J. E. 2007. *Validación secundaria del método de recuento en placa en superficie de Bacillus cereus y Staphylococcus aureus en muestras de alimentos en un laboratorio de referencia*. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana.
- SIPSA (Sistema de Información de Precios del Sector Agropecuario). 2008. Boletín Semanal, enero 5-11, 13 (2): 15.
- Soler, J. P. 2006. Validación secundaria del método del número más probable y recuento en placa profunda para coliformes totales y fecales en muestras de alimentos basada en la norma ISO NTC 17025. Pontificia Universidad Javeriana.
- Villalobos, A., Calderón, L., Figueroa, C., Fierro, J. G., Otálora, R., Álvarez, B. *et al.* 2007. Evaluación por método ecométrico de agar obtenido de algas rojas colombianas. *Universitas Scientiarum*, 12 (III): 57-65.