



**EVALUACIÓN POR MÉTODO ECOMÉTRICO DE AGAR
OBTENIDO DE ALGAS ROJAS COLOMBIANAS**

**EVALUATION FOR ECOMÉTRIC METHOD OF AGAR
OBTAINED OF COLOMBIAN RED ALGAE**

¹A. Villalobos, ¹L. Calderón, ¹C. Figueroa, ¹J. Fierro, ¹G. Otálora, ²R. Álvarez, ¹B. Quevedo-Hidalgo, ¹M. Mercado-Reyes, ¹M. Huertas-Valero, ¹A. Trespalacios-Rangel

¹ Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana. Carrera 7 No 43-82, Bogotá, Colombia

²Fundación Maguare. Manizales (Caldas) Colombia
alba.trespacios@javeriana.edu.co

Resumen

La finalidad de este estudio fue evaluar la productividad del agar-agar obtenido a nivel de laboratorio de dos especies de algas rojas del género *Gracilaria* provenientes de la costa Caribe de Colombia (*G. cylindrica* y *G. mammillaris*). La productividad del medio de cultivo elaborado con base agar - agar se determinó utilizando el método ecométrico con 20 especies bacterianas diferentes. Los valores del índice de crecimiento absoluto (ICA) e índice de crecimiento relativo (ICR) obtenidos mostraron que el agar base *Gracilaria mammillaris* y *Gracilaria cylindrica* son igualmente productivos, con lo cual se demuestra que ambas especies se pueden utilizar en la producción de agar

Palabras clave: agar, algas marinas, *Gracilaria cylindrica*, *Gracilaria mammillaris*.

Abstract

The purpose of this study was to evaluate the productivity on agar-agar of two species of red algae of the genera *Gracilaria* belonging from the Colombian Caribbean coast (*G. cylindrica* and *G. mammillaris*) obtained in laboratory. Productivity of culture media elaborated with base agar - agar was determined using the ecometric method with 20 different bacterial species. Results obtained from ICA and ICR showed that agar extracted from *Gracilaria cylindrica* and *Gracillaria mammillaris* are equally productive, this shows that both species can be used for agar production. For better results, it is still necessary to optimize extraction processes and purification of agar in both species of algae.

Key words: agar, marine algae, *Gracilaria cylindrica*, *Gracilaria mammillaris*.

INTRODUCCIÓN

El agar es un polisacárido constituido de agarosa y agaropectina que se extrae de las paredes de las algas *Rhodophyta*. Se denominan algas rojas a los miembros del filo *Rhodophyta*, un grupo de algas con más de 4000 especies agrupadas en 650 géneros. Las algas rojas se caracterizan por tener pigmentos ficobilínicos que les confieren el color rojizo (ficoeritrina y ficocianina), y que enmascaran el color de las clorofilas. La mayoría de las especies crecen cerca de las costas tropicales y subtropicales debajo de la línea intermareal (Freile-Pelegrin *et al.*, 1995; Cognetti *et al.*, 2001).

La demanda de algas especialmente para la elaboración de algunos ficocoloides importantes (alginatos, agar, carragenano) ha crecido con rapidez en los últimos diez años. Este desarrollo no muestra señales de disminución debido al potencial de las algas como fuente directa de proteína, productos farmacéuticos y la demanda de gomas vegetales que será el factor que más influirá en la explotación futura de los recursos mundiales de algas marinas (McHugh, 2002).

El agar es utilizado principalmente como base para los medios de cultivo microbiológicos, aunque también tiene muchas aplicaciones en la industria alimenticia y farmacéutica a nivel mundial (Kirk, 1998). La idea de utilizar el agar como soporte de medio de cultivo bacteriano sólido, fue concebida por la alemana Frau Fanny Eilshemius Hesse en 1881. El descubrimiento fue dado a conocer a Robert Koch, quien empleó esta sustancia como medio de cultivo en sus famosos experimentos sobre el bacilo de la tuberculosis. En su nota preliminar acerca de dicho microorganismo, publicada en 1882, Koch anunció el agar como un nuevo medio sólido para cultivo microbiológico. Desde entonces

se ha convertido en el uso más común para el mismo (Freile-Pelegrin *et al.*, 1995).

Actualmente la totalidad del agar para uso microbiológico que se consume en Colombia se importa de otros países como Estados Unidos, Chile y Portugal. En cuanto a la diversidad de algas disponible en el Caribe colombiano, tanto en la zona costera como en las zonas oceánicas se dice que actualmente existen 565 especies de algas (16 verde-azuladas, 165 verdes, 70 pardas y 314 rojas) (Díaz-Pulido y Díaz-Ruiz, 2003).

El análisis ecométrico establece la eficiencia con la cual un medio de cultivo sirve para recuperar una cepa, mediante la comparación que se realiza entre el medio a evaluar y un medio control. Esta técnica 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). Un parámetro útil para interpretar los resultados ecométricos es el índice de crecimiento absoluto (ICA). Éste denota el último sector de la placa en el cual ha habido un crecimiento significativo. Otro parámetro es el índice de crecimiento relativo (ICR) que relaciona los valores de ICA del medio a evaluar con el ICA del medio control (Mossel, 2003).

El objetivo de este trabajo fue evaluar la productividad de un medio de cultivo preparado con agar obtenido de algas marinas *Gracilaria mamillaris* y *Gracilaria cylindrica*. Se plantearon dos hipótesis, en la primera se propuso que no debía existir diferencia de proporciones de cepas con resultados de ICA alta y medianamente productivos entre los medios prueba y los medios control y la segunda hipótesis planteó que los medios prueba con resultado de ICR=1, tienen una capacidad de recuperación de cepas superior al 80%.

MATERIALES Y MÉTODOS

Algas rojas

La colecta de las algas se realizó, en el sitio denominado "Punta La Loma", municipio de Santa Marta, departamento de Magdalena - Colombia, Coordenadas geográficas 11° 07' 34" N, 74° 14' 00" W; en un arrecife coralino fósil, con restos de moluscos y raíces de mangle litificadas. Se realizaron mediciones de salinidad, temperatura y oxígeno. Los parámetros medidos en el agua fueron temperatura (26,8° C), salinidad (38,0 ups), pH (7,0 unidades) y oxígeno (7,5 ml/l). Luego se procedió a la clasificación taxonómica de las algas colectadas mediante morfometría, por parte del biólogo marino Ricardo Álvarez León, y luego fueron comparadas y confirmadas con la colección de algas del Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras "José Vives D'Andreis" INVEMAR, Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano – seccional Caribe y la colección de algas del profesor Germán Bula Meyer (q.p.d.) en la Universidad del Magdalena, en donde además se realizó un depósito de las especies de algas utilizadas en este estudio. Las especies escogidas fueron clasificadas como *G. mamillaris* y *G. cylindrica*.

Agar

El agar empleado en este estudio fue obtenido a partir de un proceso de extracción ácido basado en la decoloración previa de las algas con hipoclorito de sodio 3%. Las algas decoloradas y lavadas fueron cocinadas en agua (8,333 ml/g alga) por un tiempo de 6 horas, en la extracción se empleó vinagre como coadyuvante en una proporción de 10 g de vinagre por cada 1000 g de alga a cocinar. El extracto líquido obtenido fue congelado y descongelado, y finalmente secado en bandejas a 70 °C (Coello, 2004).

Microorganismos

Se utilizaron 20 especies bacterianas como microorganismos referentes para los análisis de productividad por el método ecométrico:

Bordetella bronchiseptica CMDM-PUJ 039, *Citrobacter freundii* CMDM-PUJ 044, *Enterobacter agglomerans* CMDM-PUJ 032, *Escherichia coli* CMDM-PUJ 034, *Klebsiella pneumoniae* CMDM-PUJ 041, *Morganella morganii* CMDM-PUJ 052, *Providencia stuartii* CMDM-PUJ 053, *Pseudomonas aeruginosa* CMDM-PUJ 054, *Pseudomonas aeruginosa* CMDM-PUJ 055, *Salmonella choleraesuis* CMDM-PUJ 074, *Salmonella paratify A* CMDM-PUJ 009, *Salmonella paratify B* CMDM-PUJ 009A, *Salmonella typhi* CMDM-PUJ 045, *Salmonella typhimurium* CMDM-PUJ 031, *Shigella flexneri* CMDM-PUJ 005, *Shigella dysenteriae* CMDM-PUJ 006, *Staphylococcus epidermidis* CMDM-PUJ 058, *Streptococcus agalactiae* CMDM-PUJ 043, *Streptococcus mutans* CMDM-PUJ 022 y *Streptococcus pyogenes* CMDM-PUJ 079. *Streptococcus pneumoniae* CMDM-PUJ 024, fue utilizado como microorganismo interferente. Todas las cepas fueron obtenidas en la Colección de Microorganismos del Departamento de Microbiología de la Pontificia Universidad Javeriana en Bogotá, DC; (CMDM – PUJ). Como microorganismos referentes se seleccionaron bacterias de crecimiento rápido, poco exigentes en sus requerimientos nutricionales y de fácil desarrollo en medios de cultivo simple. Como microorganismo interferente se seleccionó un microorganismo de crecimiento exigente, incapaz de desarrollarse en medios de cultivo simples.

Con el fin de asegurar la viabilidad de las distintas especies bacterianas y determinar la fase exponencial de cada una de ellas, se

realizaron curvas de crecimiento por triplicado en caldo BHI. Los cultivos iniciales de cada una de las especies se incubaron por 18 horas a 37°C en agar McConkey para las enterobacterias y en agar sangre para los cocos Gram positivos y para *B. bronchiseptica*. El inóculo se preparó con 2 ml de la suspensión de la respectiva bacteria en solución salina 0,85% (p/v) llevada al tubo n° 1 de la escala de Mc Farland y 18 ml de caldo BHI (infusión cerebro corazón), y se incubó por 12 horas a 37°C a 150 rpm. Para la fermentación discontinua, se mezcló el anterior inóculo con 180 ml de BHI estéril (10% del volumen total del inóculo) y se mantuvo durante 24 horas en las mismas condiciones del inóculo (37°C a 150 rpm). Se realizaron muestreos cada dos horas para realizar las curvas de crecimiento.

El medio nutritivo para las pruebas microbiológicas se preparó según el protocolo PNT-ME-010 y la composición final del medio fue: peptona 5 g/l, extracto de levadura 5 g/L y cloruro de sodio 5 g/L. Para los diferentes procedimientos del método ecométrico se utilizó agar bacteriológico de dos casas comerciales diferentes y agar bacteriológico obtenido de *G. cylindrica* y *G. mamillaris*.

Concentración de agar-agar

Con el agar-agar extraído de las algas rojas colombianas, se realizaron diferentes concentraciones (g/l): 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0 y 5,0% (p/v), se hidrataron durante 1 hora en agua tibia, y se dejaron a fuego lento hasta alcanzar su ebullición. Posteriormente se hicieron pruebas de gelificación para determinar la concentración ideal o de mayor consistencia.

Pruebas microbiológicas

El agar-agar sin adición de nutrientes fue inoculado con *S. epidermidis*, *E. coli* y *B. bronchiseptica* con el fin de verificar si el

agar aportaba nutrientes a los microorganismos.

Método ecométrico

La selección del método ecométrico se realizó teniendo en cuenta la comparación con otros como: Miles-Misra, y el de estrías (Michanie, 1992). Según Kornacki *et al* (2003), entre las ventajas del método ecométrico se destacan la facilidad y rapidez en la ejecución de la prueba, la eficiencia para evaluar varios lotes de medios de cultivo y el uso de un inóculo estandarizado en donde se garantiza la misma cantidad de microorganismo en todas las siembras.

La evaluación de la productividad del medio de cultivo se realizó a través del análisis del método ecométrico (Mossel, 2003) el cual se procesó por triplicado para cada una de las especies bacterianas.

Se inoculó el medio de prueba (agar nutritivo con agar base *G. mamillaris* y *G. cylindrica* respectivamente) y dos controles comerciales (control 1 y control 2)

Por medio de este método se evaluó la eficiencia con la cual el medio de cultivo sirve para recuperar los diferentes microorganismos, mediante la comparación que se realiza entre un microorganismo referente y un microorganismo interferente. En este estudio el microorganismo interferente fue *S. pneumoniae*, y los referentes fueron los 20 restantes mencionados anteriormente.

Un parámetro útil para interpretar los resultados es el índice de crecimiento absoluto (ICA), el cual se calculó para determinar la productividad de los medios. La interpretación de este índice se fundamenta en la siguiente clasificación: ICA menor a 2,5 (bajamente productivo), ICA entre 2,5-4,0 (medianamente productivo) e ICA mayor a 4,0 (altamente productivo). Medios con

ICA menor a 2,5 no deben utilizarse, ni salir al mercado.

Los valores de ICA obtenidos se expresaron como índice de crecimiento relativo (ICR), para comparar el medio prueba con un medio de referencia, en este caso con los dos controles comerciales. Éste se obtuvo con la fórmula; $ICR = ICA \text{ prueba} / ICA \text{ control}$. Interpretando el $ICR > 1$ como resultado altamente favorable para el medio prueba.

Análisis estadístico

Con el fin de probar si existían diferencias en la proporción de productividad (ICA e ICR) se realizó una prueba de hipótesis para la proporción a un nivel de significancia del 5%, y para determinar la capacidad que tiene el medio prueba de recuperar cepas, se probó la hipótesis de:

H_0 = La proporción de cepas con ICR mayor o igual a 1 es mayor o igual a 80%.

H_1 = la proporción de cepas con ICR mayor o igual a 1 es mayor a 80%.

RESULTADOS

Concentración de agar-agar

Los resultados de los ensayos preliminares demostraron que las mejores consistencias fueron las concentraciones de 5,0, 4,5 y 4,0%; debido a que los resultados obtenidos fueron muy similares, se tomó la menor concentración (4,0%) para un mejor aprovechamiento del agar. El aspecto del agar en todas las concentraciones fue transparente y sin precipitados, obteniéndose resultados igualmente satisfactorios.

Pruebas microbiológicas

No se observó crecimiento de *S. epidermidis*, *E. coli* y *B. bronchiseptica* en los me-

dios que sólo contenían agar y a los cuales no se les adicionó ningún tipo de nutrientes. Esto demuestra que el agar-agar producido no contiene nutrientes que favorezcan el crecimiento de las bacterias.

Método ecométrico

Los resultados obtenidos mediante el método ecométrico permitieron evaluar los medios elaborados con agar de *G. cylindrica* y *G. mamillaris* y compararlos con los medios preparados con agares comerciales. Los valores de ICA e ICR (valores no mostrados) permitieron clasificar los microorganismos en productividad baja, media o alta (tabla 1).

La tabla 2 muestra la proporción de microorganismos con resultados de alta y mediana productividad para los medios preparados con agares de las dos especies de algas *G. cylindrica* y *G. mamillaris* y los controles comerciales (1 y 2). Estos resultados no evidenciaron diferencias estadísticamente significativas (tabla 3).

Con respecto a la comparación de la proporción de cepas recuperadas por el medio de *G. cylindrica* y con los controles 1 y 2 ($ICR = 1$), no se observó diferencia estadísticamente significativa en ambos casos ($p = 0,90$) y ($p = 0,69$) respectivamente. En cuanto a la proporción de cepas recuperadas por el medio de *G. mamillaris* con respecto a los controles 1 y 2 ($ICR = 1$) tampoco se observó diferencia significativa ($p = 0,99$) y ($p = 0,32$) respectivamente. Los resultados se muestran en la tabla 4.

DISCUSIÓN

La concentración óptima de agar-agar para lograr la gelificación de los medios de cultivo en este estudio fue alta (4%) comparada con la concentración de los agares comerciales 1,5%. A este respecto podemos decir que es influenciada por el método de

Tabla 1
Productividad de los microorganismos referentes de *G.mammillaris*, *G. cylindrica*, control 1 y control 2

Productividad	Microorganismos Referentes				
	<i>G. mammillaris</i>	<i>G. cylindrica</i>	Control 1	Control 2	
Baja	<i>B. bronchiseptica</i>	<i>B. bronchiseptica</i>	<i>B. bronchiseptica</i>	<i>P. stuartii</i>	
	<i>S. cholerasuis</i>	<i>S. paratiphy A</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. cholerasuis</i>	
		<i>S. enteritidis</i>	<i>S. flexneri B42</i>	<i>S. flexneri B42</i>	
			<i>S. cholerasuis</i>	<i>B. bronchiseptica</i>	
Media	<i>E. aglomerans</i>	<i>E. aglomerans</i>	<i>E. aglomerans</i>	<i>E. aglomerans</i>	
	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	
	<i>P. stuartii</i>	<i>M. morgani</i>	<i>P. stuartii</i>	<i>P. aeruginosa</i> CMDM-PUJ 054	
	<i>P. aeruginosa</i> CMDM-PUJ 054	<i>P. stuartii</i>	<i>C. freundii</i>	<i>S. paratiphy A</i>	
	<i>S. paratiphy A</i>	<i>P. aeruginosa</i> CMDM-PUJ 054	<i>S. paratiphy A</i>	<i>S. paratiphy B</i>	
	<i>S. paratiphy B</i>	<i>S. paratiphy B</i>	<i>S. paratiphy B</i>	<i>S. typhi</i>	
	<i>S. typhi</i>	<i>S. typhi</i>	<i>S. typhi</i>	<i>S. typhimurium</i>	
	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. disenteriae</i> A8A8C	<i>S. epidermidis</i>	
	<i>S. flexneri B42</i>	<i>S. flexneri B42</i>	<i>S. agalactiae</i>	<i>S. agalactiae</i>	
	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. agalactiae</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. mutans</i>	
	<i>S. agalactiae</i>	<i>S. pyogenes</i>	<i>S. pyogenes</i>	<i>S. pyogenes</i>	
	<i>S. mutans</i>		<i>E. coli</i>	<i>C. freundii</i>	
	<i>S. pyogenes</i>			<i>E. coli</i>	
	Alta	<i>C. freundii</i>	<i>C. freundii</i>	<i>P. aeruginosa</i> CMDM-PUJ 054	<i>M. morgani</i>
		<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>M. morgani</i>	<i>P. aeruginosa</i> CMDM-PUJ 055
		<i>M. morgani</i>	<i>P. aeruginosa</i> CMDM-PUJ 055	<i>P. aeruginosa</i> CMDM-PUJ 055	
<i>P. aeruginosa</i> CMDM-PUJ 055		<i>S. cholerasuis</i>			
		<i>S. mutans</i>			

Tabla 2
Proporción de cepas alta y medianamente productivas

Productividad	ICA <i>G. mammillaris</i>		ICA <i>G. cylindrica</i>		ICA Control 1		ICA Control 2	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Alta y media	(17/19)	89,5	(16/19)	84,2	(15/19)	79	(16/19)	84,2

Tabla 3
Significancia estadística de la proporción de cepas alta y medianamente productivas de los medios prueba con respecto a los controles

Medios a comparar	Valor de p	IC 95%
<i>G. mammillaris</i> vs Control 1	0,37	0-33
<i>G. mammillaris</i> vs Control 2	0,63	0-26
<i>G. cylindrica</i> vs Control 1	0,67	0-30
<i>G. cylindrica</i> vs Control 2	1,0	0-23

Tabla 4
Proporción de la capacidad de recuperación de los medios en estudio con respecto a los controles

Medios a comparar	ICR > 1	IC 95%	Valor de p
<i>G. mammillaris</i> vs Control 1	52,3	31-73	0,99
<i>G. mammillaris</i> vs Control 2	68,2	52-91	0,32
<i>G. cylindrica</i> vs Control 1	66,6	45-90	0,90
<i>G. cylindrica</i> vs Control 2	75,0	53-96	0,69

extracción y el tipo de alga procesada, ya que el método ácido de extracción no fue eficiente para este tipo de algas, lo que indica que otros métodos de extracción deben ser ensayados para obtener una mayor fuerza de gelificación. Un estudio realizado en México por Freile-Prelegrín y Murano (2005), reporta la extracción de agar por método alcalino con de hidróxido de sodio, concluyendo que el agar presentaba una buena fuerza gelificante comparable con la calidad del agar comercial, demostrando que el tratamiento alcalino es más efectivo que el ácido, debido a que se reduce el contenido de sulfatos y aumenta la fuerza de gel.

Los resultados demuestran que el método ecométrico es adecuado para evaluar medios de cultivo microbiológico como lo confirman estudios realizados por Michanie (1992) quienes destacan las ventajas de este método como son la fa-

cilidad y rapidez de ejecución. Kornacki *et al* (2003) afirman que el método es una alternativa aceptable cuando se compara con otras más laboriosas e ineficientes.

Las pruebas estadísticas que se realizaron para demostrar la productividad de los medios en estudio, indicaron que no existieron diferencias entre éstos y los controles poniendo de manifiesto que el agar preparado con *G. mammillaris* y *G. cilyndrica* no afecta positiva o negativamente el medio de cultivo, confirmando que éstos son una materia prima adecuada para la preparación de medios de cultivo en el laboratorio.

Con respecto a la capacidad de recuperación de los medios en estudio las pruebas no demostraron superioridad al compararlas con los controles, sin embargo, dicha capacidad de recuperación es superior al 50% cuando se comparan los medios de *G. mamamillaris* y *G. cilyndrica* con el con-

trol 2, lo que indicaría una mayor similitud del agar en estudio con el control 2 aunque es desconocida el alga de la cual se obtienen los agares comerciales.

CONCLUSIONES

La productividad de los medios nutritivos preparados con los agares obtenidos de las especies *G. mammillaris* y *G. cylindrica* se comporta de manera similar a los controles.

La proporción de cepas recuperadas (resultados de ICR =1) por el medio de *G. cylindrica* y de *G. mammillaris* con respecto al control 1 y al control 2, no superó el 80%.

Los resultados demuestran que el agar-agar obtenido de las algas en estudio no es tóxico para los microorganismos y se comporta de forma inerte en el medio de cultivo preparado, siendo un soporte para la gelificación de medios sólidos.

AGRADECIMIENTOS

Este artículo se originó del proyecto n° 1571 financiado por la Fundación para la Promoción de la Investigación y la Tecnología – Banco de la República y del proyecto 1373 financiado por la Vicerrectoría Académica de la Pontificia Universidad Javeriana. Los autores agradecen a las entidades antes mencionadas el apoyo recibido para realizar este trabajo.

LITERATURA CITADA

CALDERÓN, L. y VILLALOBOS, A. Determinación de la productividad del agar microbiológico a partir de algas rojas (*Gracilaria mammillaris*) con diferentes especies bacterianas, trabajo de grado, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, 2003.

COELLO, S. Extracción de agar a partir de algas rojas pertenecientes al género *Gracilaria* a nivel de laboratorio, trabajo de grado, Fundación Universidad de América, Bogotá, 2004.

COGNETTI, G., SARA, M. y MAGAZZU, G. *Biología marina*, 1ª edición, Bologna, España, 2001, 619.

DÍAZ-PULIDO, G. y DÍAZ-RUIZ, M. Diversity of benthic marine algae of the Colombia Atlantic. *Biota Colombiana*, 2003, 4 (2), 203-46.

FIERRO, J y OTÁLORA, J. Determinación de la productividad de agar base *Gracilaria cilíndrica*, trabajo de grado, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, 2005.

FIGUEROA, C. Productividad del agar bacteriológico obtenido a partir de *Gracilaria mammillaris*, alga roja nativa del caribe colombiano, trabajo de grado, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, 2005.

FREILE-PELEGRÍN, Y., ROBLEDO, D. y GARCÍA-REINA, A. Seasonal agar yield and quality in *Gelidium cariensis* (Grunow) Seoane - Camba (Gelidiales: Rhodophyta) from Gran Canaria, Spain. *Journal Applied Phycology*, 1995, 7, 141-4.

FREILE-PELEGRÍN, Y. y MURANO E. Agars from three species of *Gracilaria* (Rhodophyta) from Yucatán Peninsula. *Bioresource technology*, 2005, 96(3), 295-302.

KIRK, R. *Enciclopedia de tecnológica química*, 1ª edición, Limusa, México, DF, México, 1998, 1494.

KORNACKI, J., GURTLER, J., YAN, Z. y COOPER, M. Evaluation of several modification of an ecometric tech-

- nique for assessment of media performance. *Journal of Food Protection*, 2003, 66 (9), 1727-32.
- MCHUGH, D.J. *Perspectivas para la producción de algas marinas en los países en desarrollo*, FAO, circular de pesca n° 968, Roma, Italia, 2002, 30.
- MICHANIE, S. Comparación de tres métodos empleados para la calidad de medios de cultivo sólidos. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 1992, 3, 311-7
- MOSSEL, D.A.A. *Microbiología de los alimentos*, 2ª edición, Acribia, Zaragoza, España, 2003, 703.
- Recibido: 09-02-2007
Aprobado: 30-08-2007