UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA

VALORACIÓN HIGIÉNICO-SANITARIA DE LA MACROALGA COMESTIBLE *ULVA* SPP., EN LA PALOMA, DEPARTAMENTO DE ROCHA: ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS Y DE CALIDAD

por

Noelia CORTAZZO GIORDANO
María Victoria PEREZ PORRAS

TESIS DE GRADO presentada como uno de
los requisitos para obtener el título de Doctor
en Ciencias Veterinarias
Orientación: Higiene, Inspección,
Control y Tecnología de los Alimentos de Origen Animal

MODALIDAD: ESTUDIO DE CASO

MONTEVIDEO
URUGUAY
2015

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis aprobada por:

Presidente de mesa: _____
Nombre completo y firma

Segundo Miembro (Tutor): _____
Nombre completo y firma

Tercer Miembro: _____
Nombre completo y firma

Co- Tutor: _____
Nombre completo y firma

Fecha: _____

Autoras:

Noelia Cortazzo Giordano _____
Firma

María Victoria Pérez Porras _____
Firma

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer a los docentes que fueron un pilar fundamental para que este trabajo pudiera llevarse a cabo, y por siempre estar apoyándonos y guiándonos para poder culminarlo con éxito. Muchas gracias José Pedro Dragonetti, Cristina Friss y Graciela Fabiano.

A todas las personas que nos ayudaron en el correr de este proyecto, y que su aporte fue fundamental para poder realizar diferentes trabajos fuera de la Institución, como ser el Dpto. de Bromatología de la Intendencia Municipal de Montevideo, y al Dpto. de Bromatología de la D.N.S.FF.AA (Hospital Militar). Y también dentro del propio Instituto de Investigaciones Pesqueras de la Facultad de Veterinaria, muchas gracias a Mario Garabello.

A la Dirección Nacional de Recursos Acuáticos (Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca) por el apoyo técnico y la utilización de los equipos de registros de variables ambientales durante las salidas de campo, así como también el acceso a la base de datos ambientales en el mar.

A nuestras familias que supieron acompañarnos en este largo camino.

A todos nuestros amigos.

TABLA DE CONTENIDO

Página

PÁGINA DE APROBACIÓN……..... **2**

AGRADECIMIENTOS…… **3**

LISTADO DE CUADROS Y FIGURAS……... **4**

1. RESUMEN…… **5**

2. SUMMARY…… **6**

3. INTRODUCCIÓN…… 7

4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA……..... 8

4.1. Características de las algas en general**……..** 8
4.2. Usos de las algas**……** 8
4.3. Algas del genero *Ulva* spp**…….** 9
4.4. Antecedentes de la valoración microbiológica de las algas para la fabricación de alimento humano**……....** 11

4.4.1 México: *Ulva lactuca* y *Ulva clrthrata***…….** 11
4.4.2 Argentina: *Monostroma undulatum***…….** 11
4.4.3 Argentina: *Porphyra columbiana***…….** 12
4.4.4 Turquía: *Ulva lactuca***…….....** 12

4.5. Legislación internacional**……** 12

4.5.1 Código Alimentario Argentino**…….** 12
4.5.2. Reglamento Centroamericano de Alimentos**……..** 13
4.5.3. Estándares Microbiológicos Francia, Suecia y Japón.. 13

4.6. Calidad de las algas para consumo**……** 14

5. OBJETIVOS…… 15

5.1. Generales**……** 15
5.2. Particulares**……** 15

6. MATERIALES Y MÉTODOS…… 15

6.1. Lugar de muestreo..... 15
6.2. Recolección de muestras 17
6.3. Procesamiento de las muestras..... 17
6.4. Procesamiento microbiológico..... 18
6.5. Procesamiento en el laboratorio..... 19
6.6. Procedimientos utilizados para determinación de Salmonella spp..... 20

6.6.1 Hospital Militar..... 20
6.6.2 Intendencia de Montevideo..... 21

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... 22

7.1. Muestras frescas..... 22
7.2. Muestras secas..... 24
7.3. Muestras congeladas..... 24
7.4. Características de las muestras..... 25

8. CONCLUSIONES..... 28

9. BIBLIOGRAFÍA..... 29

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Figura 1. Productos Buscavientos® 7

Figura 2: *Ulva fasciata* *9*

Figura 3: *Ulva lactuca* *9*

Figura 4: Características morfológicas de *Ulva* spp. 10

Figura 5: Algas con arena y restos de bivalvos 14

Figura 6: Mapa aéreo de la Zona de colecta: Zanja Honda, La Paloma 15
(Lat - 34,660707, Lon - 54,184976).

Figura 7: Foto panorámica de la zona de colecta. Zanja Honda, La Paloma 16

Figura 8: Cajas isotérmicas para el transporte de las algas refrigeradas ... 17

Figura 9: Medios de cultivos utilizados 18

Figura 10: Muestras de algas secas 18

Figura 11: Procedimiento en el laboratorio. Campana de flujo laminar …… 19

Figura 12: estufa para incubar las muestras 20

Tabla 1: Estándares microbiológicos Francia, Suecia y Japón 13

Tabla 2: Temporada alta – Fresco / Incubación 48hs 23

Tabla 3: Temporada alta – Fresco / Incubación 72hs 23

Tabla 4: Temporada baja – Fresco / Incubación 48hs 24

Grafica 1: Recuento de mesófilos en función de los meses de colecta (Datos tabla 1 y 3) 26

Grafica 2: Recuento de *S. aureus* en función de los meses de colecta (Datos Tabla 1 y 3) 26

1.- RESUMEN

Se evaluó la calidad microbiológica de la macroalga comestible *Ulva* spp. la cual se desarrolla en la zona de Zanja Honda, en el balneario La Paloma, departamento de Rocha, Uruguay. Para ello, se recolectaron 11 muestras en total durante el año 2011, contemplando la temporada alta en cuanto al turismo (1° de diciembre a 28 de febrero), y la temporada baja (1° de marzo al 30 de noviembre). Se trabajó con muestras frescas, secas y congeladas. Se realizaron exámenes microbiológicos para determinar la presencia de mesófilos totales, coliformes totales, coliformes fecales, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus, Vibrio* spp., hongos y levaduras, según las técnicas recomendadas por BAM (Bacteriogical Analytical Manual), AOAC (Official Methods of Analysis), y ICSMF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods). Se realizó también la evaluación de calidad en cuanto al aspecto macroscópico, color y forma, y presencia de materiales extraños (restos de concha, arena, etc.). En ninguna de las muestras se obtuvo recuentos de *Escherichia coli*, *Vibrio* spp., y *Salmonella* spp. Los recuentos de coliformes y hongos se mantuvieron por debajo de los límites internacionales establecidos como referencia para recuento en placa, con valor estimado <10 ufc/g. El recuento promedio de mesófilos fue de 73 x 10^2 ufc/g (valor máximo 40 x 10^3 ufc/g) en temporada alta, y de 37 x 10^1 ufc/g (valor máximo 25 x 10^2 ufc/g) en temporada baja. En cuanto al recuento de *S. aureus* se obtuvo en promedio de 1.2 x 10^1 ufc/g (valor máximo 42 x 10^1 ufc/g) en temporada alta, y en temporada baja el único valor por encima de 10 ufc/g fue de 12 x 10^1 ufc/g. En base a los valores internacionales establecidos tomados como referencia, se pudo concluir que estas algas son aptas para el consumo humano.

2.- SUMMARY

We evaluated the microbiologic quality of the edible macroalgae, *Ulva* spp., which grows in Zanja Honda in the seaside resort called La Paloma, located in Rocha, Uruguay. A total of eleven samples of the alga were collected throughout the year 2011, including the tourism peak season (between December 1st. and February 28th.), and the low season (between March 1st. and November 30th.). Fresh, dried and frozen samples were studied. Microbiological tests were performed to determine the amount of total mesophiles and coliforms, fecal coliforms, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Vibrio* spp., fungus and yeasts, according to the techniques recommended by BAM (Bacteriological Analytical Manual), AOAC (Official Methods of Analysis) and ICSMF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods). We also performed the quality evaluation depending on the macroscopic aspect, color and shape, and presence of strange materials (shell rests, sand, etc.). None of the samples showed counts of Escherichia coli, *Vibrio* spp., or *Salmonella* spp.. The counts of coliforms and fungus were maintained below the internationally established limits as a reference for the count of plaque, with an estimated value of <10 ufc/g. The average count of mesophiles was of 73 x 10^2 ufc/g. (maximum value 40 x 10^3 ufc/g) in peak season and of 37 x 10^1 ufc/g (maximum value 25 x 10^2 ufc/g) in low season. Regarding the count of *S. aureus,* the average obtained was of 1.2 x 10^1 ufc/g (maxim value 42 x 10^1 ufc/g) in peak season and in low season the only value above 10 ufc/g was of 12 x 10^1 ufc/g. Based on the internationally established values taken as a reference, it was concluded that this algae are suitable for human consumption.

Revisión Lingüística

Prof. Adj. Carmen Silvia Gallo Muniz **TT EPE MDL**
Encargada del Área de Inglés
Facultad de Veterinaria
Universidad de la República

3.- INTRODUCCIÓN

Las algas verdes del género *Ulva* (Ulvophyceae-Ulvaceae), crecen en la zona intermareal de la mayoría de los océanos del mundo, en charcas de marea, rocas o sublitoral hasta 20 m. Al tolerar salinidades bajas pueden encontrarse en estuarios, y también frecuentemente en zonas donde existen aportes nitrogenados. Son conocidas comúnmente como lechuga de mar o lamilla por sus largas hojas (Méndez, 2004), aun cuando esta designación se refiere con frecuencia a una de las especies utilizada en la fabricación de diferentes alimentos (*Ulva lactuca*).

Estas macroalgas, junto a otra enorme variedad de algas, son utilizadas como recurso para el consumo humano, y apreciadas por su característico sabor marino y sus propiedades nutricionales. Se utilizan tanto frescas, como secas, lo cual además de ser una buena forma de conservarlas, permite una amplia gama de aplicaciones industriales tanto alimentarias como farmacéuticas.

El género *Ulva* es considerado una especie cosmopolita que se presenta en todo el mundo en grandes proporciones durante las estaciones de primavera y verano. Es utilizada en la alimentación humana y animal en países de Europa, Asia y América (Castro y col, 1996).

En nuestro país *Ulva lactuca* y *Ulva fasciata* son recolectadas principalmente en el litoral atlántico, fundamentalmente en el Departamento de Rocha, siendo utilizadas a nivel local en gastronomía y muy especialmente durante la temporada turística que demanda productos típicos y asociados al mar. La presentación habitual es la de bocaditos fritos. En el último tiempo su consumo ha tenido un crecimiento importante, trascendiendo los límites departamentales. Se comercializan productos elaborados con algas en restaurantes y comercios de Maldonado y Montevideo. Productos característicos fueron los bocados congelados listos para freír y las galletas saborizadas (Buscavientos®, 2011), ver Figura 1. A pesar de esto, en nuestro país son productos que recién se están posicionando en el mercado.

Aún no se cuenta con una normativa específica ni valores nacionales de referencia, para la comercialización en condiciones higiénico-sanitarias adecuadas de las algas como alimento. Por esto para el presente trabajo, tomamos como referencia valores de la legislación internacional, y antecedentes de trabajos realizados sobre la calidad microbiológica de algas comestibles en otros países.

Figura 1: Productos Buscavientos®

4.3.- Algas del genero *Ulva*

Las algas del género *Ulva (Ulva* spp.) son comúnmente denominadas lechuga de mar. Crecen tanto en zonas altas como en zonas bajas intermareales, y en agua de hasta 23 metros de profundidad. Se pueden encontrar en variadas zonas, ya sea expuestas al oleaje, en piletas de marea o sobre variados sustratos artificiales (Méndez, 1982).

Su longitud varía desde 15 cm hasta 60 cm. Su color varía desde el verde pálido en ejemplares jóvenes, verde brillante en adultas, y verde oscuro en algas muy maduras. La desecación provoca que queden blancas o negras (Cano, 2008).

La morfología es variada, pudiendo ser muy simples, con talos laminares o tubulares de formas muy diversas, en donde los factores ambientales tienen gran influencia. Cuando el ambiente es rico en nutrientes presentan gran capacidad de crecimiento (Cano, 2008).

La primera cita de *Ulva lactuca* en Uruguay fue realizada por Howe en el año 1930 (Méndez, 1982). En 1979 el género *Ulva* spp*.,* fue reportado por Javier Coll en el "Catalogo de algas citadas para el Uruguay". Más recientemente, en el año 2005 en Cabo Polonio, se llevó a cabo un relevamiento de fauna y macroalgas, en el cual se menciona la presencia de *Ulva lactuca y U. fasciata* (Peluffo, 2005).

Ulva lactuca y *U. fasciata* son muy abundantes en el entorno de la localidad de La Paloma (Figura 2, 3 y 4), y son las únicas que se colectan en Uruguay para el consumo humano.

Se puede encontrar en variadas zonas, ya sea expuesta al oleaje, en piletas de marea o sobre variados sustratos artificiales (Mendez, 1982).

Figura 2: *Ulva fasciata*

Figura 3: *Ulva lactuca*

El alga *Ulva* spp. es comúnmente denominada lechuga de mar. Su color varía desde el verde pálido en ejemplares jóvenes, verde brillante en adultas, y verde oscuro en algas muy maduras. La desecación provoca que queden

4.4.- Antecedentes de la valoración microbiológica de las algas para la fabricación de alimento humano

En Uruguay no encontramos antecedentes de trabajos en donde se evaluara la calidad microbiológica de las algas verdes como alimento. La legislación nacional actual no cuenta con valores microbiológicos de referencia para el alga como alimento, a diferencia de la legislación internacional, la cual la incluye en los capítulos de frutas verduras y hortalizas. Por esta razón se revisaron valores de referencia de otros países de la región o internacionales.

4.4.1.- México: *Ulva lactuca* y *Ulva clathrata.*

Aguila Ramírez (2008), estudió la calidad microbiológica de *Ulva lactuca* y *U. clathrata* como alimento. Ese autor cuantificó coliformes totales, fecales, y enterococos, y encuentra que la presencia de coliformes totales y fecales es en general baja para *Ulva lactuca*. Los valores más altos tomados en una de las tres localidades de donde se obtuvieron las muestras, en cuanto a coliformes totales, es de 790 NMP/100grs en el mes de abril, y 1100 NMP/100grs en el mes de agosto. Para coliformes fecales el máximo es de 790 NMP/100grs en la misma localidad en el mes de abril. En México no existe tampoco una norma relativa a límites microbiológicos de algas para consumo alimenticio, y se toma como referencia la norma establecida para organismos marinos de consumo humano, más específicamente la del ostión. La norma indica que los coliformes fecales no pueden exceder los 250 NMP/100grs (DOF NOM-031-SSA1-1993).

4.4.2.- Argentina: *Monostroma undulatum*.

Gallardo *et al*. (2004) en Argentina estudiaron la calidad microbiológica de las algas comestibles del género *Monostroma undulatum* es un alga verde del Orden Ulvales muy similar por su morfología exterior a las algas del género *Ulva*. El lugar del muestreo se situó en la provincia de Santa Cruz, Argentina; donde se encuentra la colonia de algas más importante de la Patagonia Argentina. Los autores mencionados analizaron bacterias heterótrofas psicrótrofas, heterótrofas marinas, bacterias de bajo requerimiento nutricional (B.B.R.N.), *Vibrio* spp., coliformes totales, coliformes termotolerantes, bacterias anaerobias sulfito reductoras de esporas, hongos y levaduras.

En ese estudio en el total de las muestras analizadas no se detectaron coliformes totales ni termotolerantes, *Escherichia coli*, hongos, levaduras y bacterias anaerobias sulfito reductoras formadoras de esporas. El recuento de psicrótrofos resulta en un promedio de 2.13 ± 1.07, el de mesófilos 1.9 ± 1.06, el de heterótrofas marinas 4.17 ± 0.34, el de B.B.R.N. 2.02 ± 1.55, el de B.B.R.N marinas 3.63 ± 0.44, y el de *Vibrio* spp. 2.92 ± 0.16, expresado en log de ufc/g (unidades formadoras de colonias por gramo) ± desviación estándar. El valor más alto tomado para mesófilos y psicrótrofos es de 3.14 ± 1.22 y 3.14 ± 1.24 ufc/g respectivamente (Gallardo *et al*, 2004).

4.4.3.- Argentina: *Porphyra columbiana.*

En el 2003, Estevao Belchior *et al*, analizaron la calidad microbiológica del alga *Porphyra columbiana*, un alga roja comestible recolectada en las costas de la Patagonia Argentina. En esta zona es consumida por una reducida parte de la población y residentes chilenos. Los autores cuantificaron bacterias aerobias heterótrofas (2.47ufc/g), marinas (4.38 ufc/g), de bajos requerimientos nutricionales (4.36 ufc/g), y *Vibrio* spp. (3.51 ufc/g); resultados expresados en logaritmo base 10 ufc/g. En las muestras analizadas no se detectan coliformes totales, fecales, hongos, levaduras, ni anaerobias sulfito reductoras.

4.4.4- Turquía: *Ulva lactuca*.

Un estudio microbiológico en *Ulva lactuca* cultivada en tanques al aire libre y secadas al sol, realizado en Urla Marine Center de la Universidad Egeo (Izmir, Turquía), en los meses de abril y marzo del 2005, muestra recuentos de aerobios mesófilos, coliformes, y *Vibrio* spp., de 8,18 (± 0,37) x 10^4 ufc/g, 4,40 (±4,72) ufc/g, y 4,80 (± 6,91) ufc/g, respectivamente y ausencia de *Salmonella* spp. y coliformes fecales (Karacalar y Turan, 2008).

Los antecedentes de trabajos en calidad microbiológica de las algas, revisados en esta tesis, concuerdan en la inocuidad para su consumo.

4.5.- Legislación internacional

4.5.1.- Argentina: Código Alimentario Argentino, capitulo XI, sobre alimentos vegetales (actualizado 6/2013).

Artículo 878: “Con la denominación de Algas, se entienden los tejidos celulares frescos o secos de las plantas marinas, constituidos por células redondeadas o cilíndricas semejantes entre sí, que se reúnen para formar tejidos como los parenquimatosos”.

“Las algas comestibles son únicamente las macroscópicas y en particular las variedades de Porphira, Rodophytas, Laminaria, Fucus, Macrocystis, Chondrus, Gracilaria, Clopterix, etc. “

“Las que se expendan desecadas no deberán tener un contenido acuoso superior al 15%.”

4.5.2.- Reglamento Centroamericano de Alimentos (2009).

Este reglamento incluye a las algas en el grupo 4 referido a frutas y hortalizas: "Grupo 4 Frutas y hortalizas: esta categoría principal se divide en dos categorías: frutas y hortalizas frescas y frutas y hortalizas procesadas (incluidos raíces y tubérculos, legumbres y leguminosas y aloe vera), hongos comestibles y setas, algas marinas, nueces y semillas".

En el mismo, se establecen los siguientes límites microbiológicos:

a) Para producto fresco:

Coliformes fecales 93NMP/gr.
Salmonella spp./25gr ausencia.
Escherichia coli <3NMP/gr.
Listeria monocytogenes/25gr (solo para vegetales) ausencia.

b) Para el producto congelado:

Salmonella spp./25gr ausencia.
Coliformes fecales <3NMP/gr.
Listeria monocytogenes/25gr ausencia.

c) Para el producto deshidratado:

Coliformes fecales 20NMP/gr.
Escherichia coli <3NMP/gr.
Salmonella spp./25gr ausencia.

4.5.3.- En la siguiente tabla (Tabla 1) se exponen los estándares de calidad microbiológica para Francia, Suecia y Japón.

TABLA 1: Estándares Microbiológicos Francia, Suecia y Japón

	Francia	Suecia	Japón
Stándard Plate Count (n° x 10^6/g)	< 0.1	<10	<0.05
Coliformes n°/g	<10	<100	<100
Coliformes fecales n°/g	-	-	-
Salmonella sp.	Negativo	Negativo	Negativo
Vibrio sp.	-	-	-

Fuente: Karacalar y Turan, 2008.

4.6.- Calidad de las algas para consumo

Además de los aspectos microbiológicos, hay otros factores que influyen en la calidad de las algas para consumo. El modo de recolección y el posterior procesamiento de la materia prima son fundamentales para lograr un buen producto final.

Para la colecta de las algas, es necesario consultar las tablas de marea que hoy en día son proporcionadas en páginas web, o en aplicaciones para teléfonos celulares. Esto permite ubicar las zonas horarias de bajamar. El momento ideal para recolectar es cuando la marea comienza a bajar. De esta forma se facilita la recolección de masas de algas sumergidas y frescas, y se evita la colecta de formas desprendidas o desecadas.

Luego de colectadas las algas, es importante conservarlas refrigeradas para que se mantengan frescas hasta su procesamiento.

El lavado es un paso fundamental. Normalmente las algas que se extraen sobre todo en zonas de oleaje, pueden presentar arena y restos de bivalvos y artrópodos que si no son removidos en su totalidad generan una respuesta sensorial desagradable en el producto final (Figura 5).

Figura 5: Algas con arena y restos de bivalvos

Las formas en la que podemos encontrar las algas en el mercado son deshidratadas, congeladas, liofilizadas o en salazón.

Se recolectan en primavera y verano y se dejan secar en planchas durante unas 48 horas. Este proceso lleva determinadas condiciones de temperatura y presión para asegurar un buen secado. Hay que taparlas en la noche y durante la lluvia, dejando la suficiente corriente de aire. Deben de perder al menos un 80% del volumen (Chavarrías, 2009).

5.- OBJETIVOS

5.1.- General:

- Identificar los parámetros higiénico-sanitarios para la evaluación de algas *Ulva* spp. como alimento para consumo humano.

5.2.- Particulares:

- Evaluar los parámetros microbiológicos de las algas frescas.
- Evaluar los parámetros microbiológicos de las algas congeladas.
- Evaluar los parámetros microbiológicos de las algas secas.
- Identificar los parámetros de calidad de las algas frescas.
- Identificar los parámetros de calidad de las algas congeladas.
- Identificar los parámetros de calidad de las algas secas.

6.- MATERIALES Y MÉTODOS

6.1.- Lugar de muestreo

Las algas recolectadas provienen del paraje conocido como Zanja Honda, en La Paloma (Departamento de Rocha – Uruguay), donde es frecuente su extracción para consumo humano. De allí se extrajeron algas sumergidas en agua y adheridas al sustrato rocoso (Figura 6 y 7).

Figura 6: Mapa aereo de la zona de colecta:

Zanja Honda, La Paloma (Lat -34,660707, Lon -54,184976).

Figura 7: Foto panorámica de la zona de colecta:

Zanja Honda, La Paloma.

La toma de muestras se realizó en dos épocas del año diferentes, que correspondieron en cuanto al turismo y aflujo de visitantes, a temporada alta (1º de diciembre a 28 de febrero), y temporada baja (1º de marzo al 30 de noviembre).

El criterio de selección para la zona de muestreo, tuvo en consideración que dicho lugar era un sitio de extracción de algas (año 2011), para la fabricación de buñuelos y bocaditos con algas. Además, es una zona de fácil acceso para cualquier persona desde la playa.

Siempre que fue posible se registraron en el sitio de obtención de muestras parámetros ambientales elementales que fueron, dado lo equipos disponibles, temperatura del agua y del aire, conductividad (Salinómetro ECOSENSE 300), turbidez (Disco de Secchi) del agua, viento (dirección por compás e intensidad subjetiva) y grado de insolación por apreciación subjetiva. Los equipos fueron proporcionados por DINARA-MGAP. No fue posible titular nutrientes.

Se utilizó además para caracterizar el período de muestreo información de variables ambientales obtenidas con frecuencia diaria por la DINARA-MGAP en el Cabo Santa María, sitio próximo al área de colecta de algas.

6.2.- Recolección de muestras

En temporada alta se realizaron 6 colectas distribuidas en el tiempo (6 lotes), hasta la semana posterior a la de turismo, considerando la mayor afluencia de personas en la zona. En temporada baja se recolectaron 5 lotes. Los lotes variaron entre 3 y 7 kg de alga fresca, según su disponibilidad por las variaciones estacionales.

La colecta se realizó de forma manual. Las algas se colocaron directamente en bolsas Ziploc®, retirando el exceso de agua, y siendo refrigeradas inmediatamente en una caja isotérmica para su transporte al laboratorio (Figura 8). Se procesaron dentro de las 24 hs de recolectadas.

Figura 8: Cajas isotérmicas para el transporte de las algas refrigeradas.

6.3.- Procesamiento de las muestras

En el laboratorio cada lote recolectado se subdividió en 3 sub-lotes. Un sub-lote fue congelado, otro sub-lote secado y otro se procesó en fresco. Para el sub-lote de algas secas, se tuvo en cuenta que el rendimiento al secar es de aproximadamente un 10%. Se rotularon los sub-lotes con fecha de colecta para procesarlos posteriormente en orden de colecta.

Se realizaron los exámenes microbiológicos de cada sub-lote, para determinar la presencia o ausencia de los siguientes microorganismos: mesófilos totales, coliformes totales, coliformes fecales, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus, Vibrio* spp., y hongos y levaduras (en el producto seco). El crecimiento y recuento de los mismos se evaluó según las técnicas recomendadas por el BAM (Bacteriogical Analytical Manual), AOAC (Official Methods), y ICSMF (Internacional Commission on Microbiological Specifications for Foods) (Figura 9).

Figura 9: Medios de cultivo utilizados.

La evaluación de calidad, consistió en la valoración del aspecto macroscópico en base a atributos como color y forma, y presencia de materiales extraños (conchilla, arena, etc.).

6.4.- Procesamiento microbiológico

Se procedió a realizar los cultivos microbiológicos de las muestras frescas y se secaron (Figura 10), y se congelaron muestras de ese lote para ser procesadas posteriormente. Estas últimas, fueron analizadas al terminar con todos los muestreos de algas frescas (con excepción de la primera muestra).

Figura 10: Muestras de algas secas.

De las muestras recolectadas, se procesó una en el laboratorio del Hospital Militar para *Salmonella* spp., y otra en el Laboratorio Bromatológico de la Intendencia Municipal de Montevideo (IMM).

Los medios utilizados fueron: el PCA (Plate count agar) para mesófilos totales, TCBS para *Vibrio* spp. (solo en muestras frescas), Petrifilm®, para determinación de *E. coli* y *Staphylococcus aureus,* medio Baird Parker para

Staphylococcus aureus, y Sabouraud dextrosa agar, para determinación de hongos y levaduras en las muestras secas. Para la determinación de *Salmonella* spp*.* en el Hospital Militar, se utilizó caldo lactosado, RVS (Rappaport Vassiliadis R10 Broth), SS Agar, Hektoen Enteric Agar, Xylose Lisien, y Verde Brillante Agar. Para los análisis en la IMM, se utilizaron los siguientes medios: RVS (Rappaport Vassiliadis Caldo), MKTTn (Muller-Kauffmann Tetrathionate-Novobiocin Broth), XLD (Xilose-Lysine-Desoxycholate), TSA (Tripticasa soya Agar), TSI (Triple Sugar Iron Agar) y LIA (Lisina Hierro Agar).

6.5.- Procedimiento en el laboratorio

Se colocaron 10 g de muestra en una bolsa de *Stomacher* con 90 ml de agua peptonada (al 0.1% y pH 7.02). Se realizaron en principio 4 diluciones en tubos con 9 ml de agua peptonada. Como los recuentos eran muy bajos, se siguieron procesando con 3 y 2 diluciones (Figura 11).

Figura 11: Procedimiento en el laboratorio. Campana de Flujo laminar.

Se fueron preparando los medios a medida que se procesaron las muestras, siguiendo con los procedimientos establecidos para cada uno de

ellos, y se realizaron las siembras según las técnicas descriptas por el BAM, AOAC e ICSMF (Figura 12). En caso de *Salmonella* spp*.,* se utilizaron dos técnicas diferentes, siguiendo con lo establecido en cada lugar donde se analizaron las mismas.

Figura 12: Estufa para incubar las muestras.

6.6.- <u>Procedimientos utilizados para determinación de *Salmonella* spp.</u>

Los procedimientos de análisis utilizados para la determinación de *Salmonella* spp. se ajustaron a los protocolos de los laboratorios del Hospital Militar y de la Intendencia de Montevideo

6.6.1.- Hospital Militar

Se pesaron 25 g de algas y se colocaron en Caldo Lactosado, se homogeinizaron y se incubaron a 35 °C durante 24 hs (preenriquecimiento).

Se hizo el enriquecimiento colocando 0.10 ml del Caldo Lactosado en 10 ml de medio selectivo RVS (Rappaport Vassiliadis R10 Broth). Se llevó a baño María a 42 °C por 24 hs.

Se sembró en medios selectivos y diferenciales SS Agar, Hektoen Enteric Agar, Xylose Lisien, Verde Brillante Agar (medios para aislamiento). Estos medios se incubaron a 37 °C por 48 hs.

Por último, se examinaron las placas para investigar la presencia de colonias típicas de *Salmonella* spp.

6.6.2.- Intendencia de Montevideo

Se colocaron las muestras de algas de 25 gr en 225 ml de agua peptonada, y se incubaron a 37 °C por 18 hs (pre-enriquecimiento).

Posteriormente, se inocularon los medios selectivos líquidos RVS 0.10 ml, y en MKTTn (Muller-Kauffmann Tetrathionate-Novobiocin Broth) 1 ml para el enriquecimiento. El medio MKTTn se disolvió a baño María. Luego se bajó la temperatura y se le agregó solución de yodo-yoduro. Se incubó a 37 °C por 24 hs. El RVS, se incubó a baño María a 41.5 °C por 24 horas.

Se pasaron a los medios XLD (Xilose-Lysine-Desoxycholate) y Verde Brillante (medios selectivos y diferenciales).

Se prepararon muestras blanco M1 y se incuban.

Al presentar colonias sospechosas, se repicaron en TSA (Tripticasa soya Agar) las muestras del medio de Mueller, M1 y se incuba durante 24 horas.

Se pasan del TSA a los medios Agar tres azucares (TSI), y al Agar de hierro y lisina (LIA), ambos medios para pruebas bioquímicas presuntivas. En el medio LIA se ve si descarboxila, o existe una desaminación de la lisina.

7.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En ninguna de las muestras analizadas tanto frescas, congeladas o secas, se obtuvieron recuentos de *Escherichia coli*, *Vibrio* spp*.,* y *Salmonella* spp. Esto es de suma importancia ya que nos referimos a los microorganismos patógenos para la salud pública. Los recuentos de coliformes y hongos se mantuvieron por debajo del límite internacional establecido como referencia para recuento en placa, con valor estimado <10 ufc/g.

Comparando estos resultados con los de otros autores (Estevao Belchior *et al ,2003;* Gallardo *et al*., 2004, Karacalar y Turan, 2008; Aguila Ramirez, 2008) es a destacar que en ninguno de estos trabajos se encontró la presencia de *Salmonella* spp. y *E. coli.* Sí se observaron en cambio, recuentos de *Vibrio* spp*.* en los sitios relevados de Argentina y en Turquía (Estevao Belchior *et al ,2003;* Gallardo *et al*.; Karacalar y Turan, 2008)*,* de coliformes totales en sitios de Mexico y Turquía (Aguila Ramirez, 2008; Karacalar y Turan, 2008) y coliformes fecales en sitios de México (Aguila Ramirez, 2008).

La no detección de los patógenos de origen fecal *Salmonella* spp. y *E. coli,* es importante desde el punto de vista de la inocuidad de las algas como de la contaminación ambiental, aunque en principio los sitios de elección para la extracción de las mismas no son los altamente contaminados por la presencia del hombre (aguas residuales).

7.1.- Muestras frescas

Los recuentos significativos para análisis, fueron los de bacterias mesófilas y *Staphylococcus aureus*. Para este último se tomaron los resultados por separado de los dos medios utilizados (Baird Parker y Petrifilm®), ya que aportaron algunas diferencias en los recuentos realizados en base a una misma muestra.

La lectura de los recuentos para estos microorganismos de las distintas muestras tomadas en fresco en temporada alta, se presenta en la Tabla 2 con 48 horas de incubación (expresados en unidades formadoras de colonias por gramo). La recolección se realizó en los meses de febrero, marzo y abril.

MUESTRA	**TABLA 2:** Temporada alta – Fresco / Incubación 48 hrs		
	Mesófilos PCA	*Staphylococcus aureus* BP	*Staphylococcus aureus* Petrifilm®
M1- 22/2	37×10^1	<10	<10
M2- 9/3	30×10^1	38×10^1	36×10^1
M3- 30/3	<10	<10	<10
M4- 6/4	23×10^2	17×10^1	32×10^1
M5- 13/4	30×10^3	<10	<10
M6- 27/4	25×10^1	<10	<10

Fuente: Elaboración propia.

En la Tabla 3 se expresan los resultados de las mismas muestras incubadas durante 72 hs. Se observa que el recuento fue mayor en 5 de las muestras. En el medio de Baird Parker, para *S. aureus* no se observaron recuentos mayores a las 72 h.

MUESTRA	**TABLA 3:** Temporada alta – Fresco / Incubación 72 hrs		
	Mesófilos PCA	*Staphylococcus aureus* BP	*Staphylococcus aureus* Petrifilm®
M1- 22/2	52×10^1	<10	<10
M2- 9/3	30×10^1	38×10^1	42×10^1
M3- 30/3	<10	<10	<10
M4- 6/4	25×10^2	17×10^1	34×10^1
M5- 13/4	40×10^3	<10	<10
M6- 27/4	25×10^1	<10	<10

Fuente: Elaboración propia.

Las muestras de temporada baja se tomaron en los meses de junio, octubre, noviembre y principios de diciembre. En promedio dio recuentos más bajos que en temporada alta. La abundancia de algas fue significativamente menor en este período, lo que es coincidente con el ciclo reproductivo descripto anteriormente.

En la Tabla 4 se presentan los resultados de dicha temporada expresados en unidades formadoras de colonias por gramo, e incubados 48 hs. El recuento a las 72 hs no resulto significativo en comparación con el de 48 hs.

TABLA 4: Temporada baja – Fresco / Incubación 48 hrs

MUESTRA	Mesófilos PCA	*Staphylococcus aureus* BP	*Staphylococcus aureus* Petrifilm®
M1- 1/6	15×10^2	<10	<10
M2- 19/10	<10	<10	<10
M3- 16/11	20×10^1	<10	<10
M4- 5/12	27×10^1	<10	<10
M5- 5/12	25×10^2	12×10^1	<10

Fuente: Elaboración propia.

En cuanto al recuento de mesófilos totales, el valor máximo que se obtuvo fue de 40×10^3 ufc/g (40.000 ufc/g), no superando los límites internacionales establecidos para Francia (<100.000 ufc/g), Japón (<50.000 ufc/g) y Suecia (<10.000.000 ufc/g). En cuanto a los trabajos citados como antecedentes, los valores de recuento para mesófilos fueron inferiores en los trabajos Argentinos (790 ufc/g y 300 ufc/g), y superior en el trabajo realizado en Turquía (81.800 ufc/g).

7.2.- Muestras secas

El recuento de las muestras secas, dio valores estimados por debajo de 10 ufc/g en el total de las muestras analizadas, los cuales son significativamente menores que en las mismas muestras en estado fresco. En base a este resultado, podemos inferir que el método de secado y su conservación en este estado, bajan significativamente los recuentos para el caso de bacterias mesófilas y *Staphylococcus aureus*, que son los que se encontraron en mayor número en las muestras frescas

7.3.- Muestras congeladas

En las muestras congeladas los recuentos tampoco fueron significativos, siendo en un valor estimado por debajo de 10 ufc/g, a excepción de dos muestras. Una de esas muestras es la extraída el 22 de febrero, que no pudo ser leída antes de las 120 hs de incubada, y dio como resultado un recuento de 84×10^1 ufc/g. La otra muestra es la del 13 de abril, leída a las 72 hs con un

recuento de 63 x 10^2 ufc/g. Siendo estas las muestras con recuentos más altos en fresco.

7.4.- Características de las muestras

La muestra fresca que tuvo los recuentos más altos de mesófilos en temporada alta, fue extraída de una zona llamada “El Cabito”, a unos 200 o 300 metros del lugar donde se recolectaron el resto de las muestras.

Se colectaron algas de color verde claro, en su mayoría de talo largo y algunos orificios. Presentaron poca cantidad de crustáceos adheridos y restos de otras algas.

La segunda muestra con recuento alto fueron algas de color verde oscuro, con artrópodos vivos y restos de crustáceos pegados, mucha arena y restos de otras algas.

El resto de las muestras estaban visiblemente limpias, aquellas recolectadas en los meses de marzo y abril en su mayoría fueron algas de color verde brillante, y de un verde más oscuro las recolectadas en febrero.

En caso de temporada baja los recuentos más altos se dieron en las muestras recolectadas en diciembre y junio.

Las de diciembre fueron algas de color verde oscuro y con poco crecimiento. La mayoría eran finas en su talo, y algunas pocas anchas. Presentaron aspecto de marchitas, como si hubiesen estado fuera del agua.

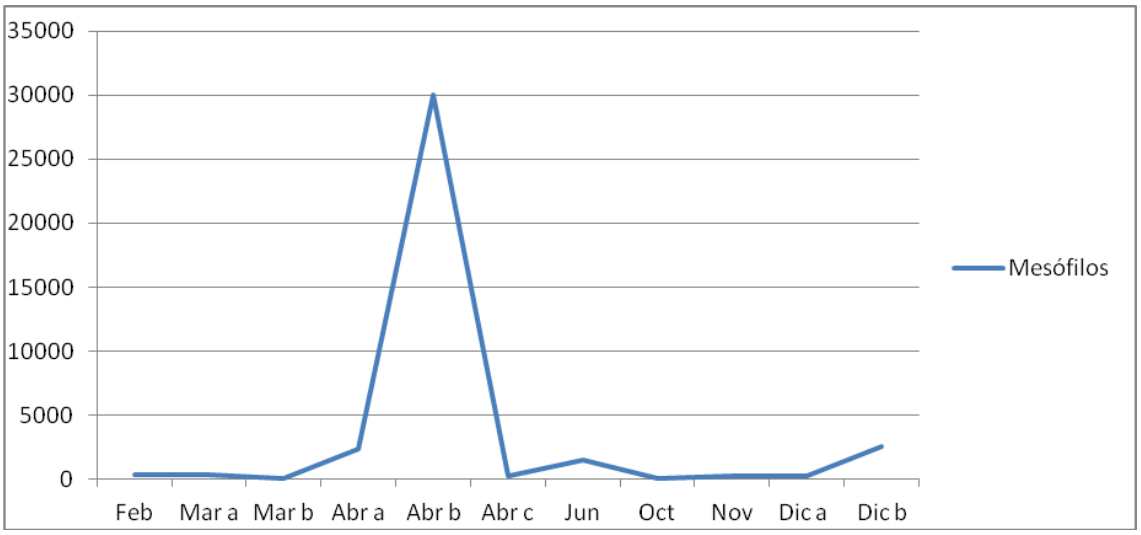
Las recolectadas en junio, fueron algas de color verde algo oscuro, de forma alargada de unos 30 a 40 cm. La marea estaba baja y algunas algas estaban por fuera del agua y presentaban color blanco.

En el resto de las muestras predominaban algas de color verde oscuro, de poca longitud y finas.

En las Gráficas 1 y 2, se expresan los resultados de los recuentos de mesófilos y *S. aureus* respectivamente, en función de los meses en los cuales se recolectaron las muestras. Para ello se tomaron los recuentos de 48 hs de incubados.

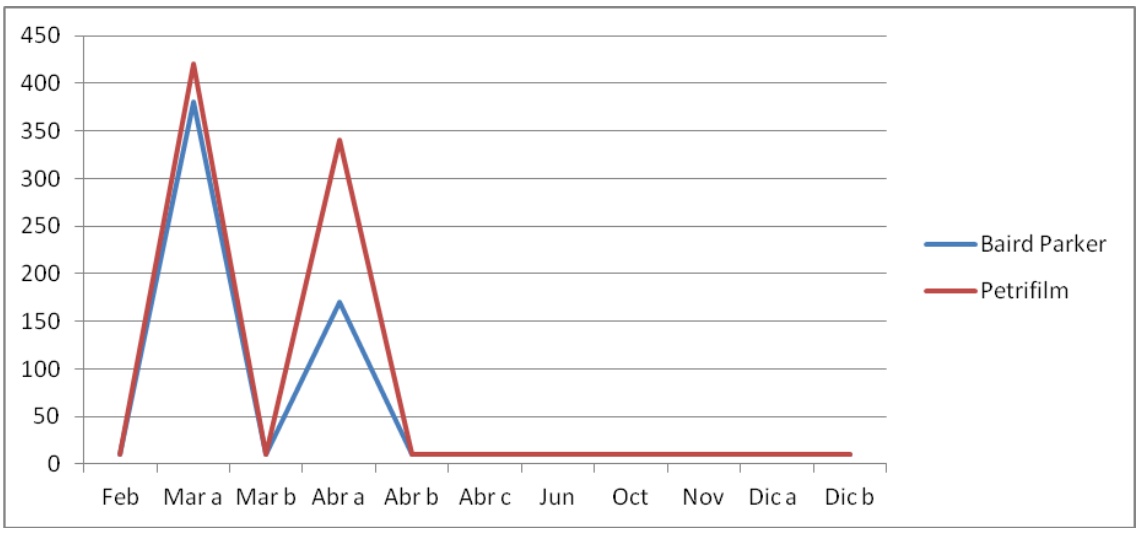
En el recuento de mesófilos, se ve claramente un marcado aumento en el mes de abril, coincidente con la etapa estacional en el cual el alga se encuentra en pleno desarrollo, y absorbiendo más cantidad de nutrientes del agua, según lo citado en el texto sobre el ciclo de crecimiento y reproducción del alga.

Gráfica 1: Recuento de mesófilos en función de los meses de colecta (Datos: Tabla 1 y Tabla 3)



En el caso de *S. aureus*, el grafico muestra una leve diferencia entre ambos medios utilizados, pudiendo ser atribuido a la manipulación de la muestra. De todas formas, ambas curvas son similares, mostrando un marcado aumento en los meses de marzo y abril.

Gráfica 2: Recuento de *S. aureus* en función de los meses de colecta (Datos: Tabla 1 y Tabla 3)



No encontramos trabajos de referencia en algas, ni legislación internacional para comparar los resultados de *S. aureus*. Se tomó como referencia el valor que establece el Reglamento Técnico Centroamericano para pescado y productos frescos. El mismo no debe superar las 10^3 ufc/g. En nuestro trabajo el recuento máximo obtenido para *S. aureus*, fue de 42 x 10^1 ufc/g, no superando los límites establecidos de referencia. Es importante tener en cuenta que este microorganismo es el que más puede variar debido a la manipulación, por ser habitante normal en muchas personas.

Según los parámetros ambientales tomados en la zona de muestreo y los datos proporcionados por la DINARA-MGAP, en los meses de colecta desde el 22 de febrero hasta el 13 de abril, la temperatura del agua varió entre 19 y 24.2 °C, la temperatura ambiental entre 19 y 28 °C, la salinidad entre 30.9 y 32.1 %, el grado de insolación entre 0/8 a 4/8 (totalmente despejado y parcialmente cubierto).

Desde el 27 de abril hasta el 5 de diciembre la temperatura del agua varió entre 15 a 17.3 °C, la temperatura ambiente entre 15 y 20.5 °C, y la salinidad entre 24.7 y 30.9 %, el grado de insolación entre 0/8 y 2/8 (prácticamente sin nubosidad).

La transparencia del agua se mantuvo clara en la mayoría de las muestras, los vientos fueron variables en dirección y la intensidad desde apenas brisas hasta moderado.

Los recuentos más altos coinciden con una temperatura mayor en la superficie del agua, mayor grado de insolación y mayor porcentaje de salinidad.

8.- CONCLUSIONES

Como resultado del estudio microbiológico realizado en *Ulva* spp. que crecen en la zona de Zanja Honda (La Paloma, Uruguay), podemos afirmar que son aptas para consumo humano.

Se comprobó la ausencia de organismos patógenos como *Salmonella* spp., *Vibrio* spp. y *Escherichia coli,* siendo esto muy importante para la salud pública. No se detectaron coliformes fecales y los recuentos de coliformes totales se mantuvieron por debajo de los límites establecidos.

En cuanto al recuento de *Staphylococcus aureus*, los valores obtenidos también se consideraron como bajos, para los límites establecidos en productos frescos marinos.

Los recuentos más elevados fueron los de mesófilos totales, pero ningún valor se situó por encima de los límites establecidos en otros países y tomados como referencia para nuestro trabajo.

Los recuentos más altos en general se dieron en algas frescas, en los meses de mayor crecimiento de ejemplares, y con temperaturas del agua mayores, siendo importante recalcar que no llevaron lavado previo al análisis como se haría en caso de que fuera para consumo.

En el caso de las algas congeladas y secas se dieron recuentos muy bajos, por lo que se concluye que cualquiera de estos dos métodos de conservación baja la carga bacteriana, sobretodo el secado.

9.- BIBLIOGRAFÍA

1.- Aguila Ramírez, R. N.; Hernández Guerrero, C. J.; Rodríguez Astudillo, S.; Guerrero Caballero, R. (2008). Calidad microbiológica de Ulva lactuca y Ulva clathrata (Chlorophyta) de la costa de La Paz B.C.S. Cicimar Oceánides 23(1-2):35-38. Disponible en: http://sistemas.cicimar.ipn.mx/ojs/index.php/oceanides/article/view/75/63. Fecha de consulta: 30/6/2015.

2.- Algas marinas: Utilidades, Propiedades y Beneficios. Disponible en: http://xananatura.blogspot.com/2012/02/algas-marinas-utilidades-propiedades-y.html. Fecha de consulta: 24/5/2014.

3.- Arteaga, M.; De Silvestri, J. (1981). Estudio de las sustancias con propiedades antimicrobianas extraordinarias de las algas marinas pertenecientes al litoral atlántico colombiano. Disponible en: http://www.ciencias.unal.edu.co/unciencias/data-file/farmacia/revista/V4N2P47-52.pdf. Fecha de consulta: 24/5/2014.

4.- Boraso A., Zaixo J. M. (2006). Algas marinas bentónicas. Disponible en: http://images.algaebase.org/pdf/562DF4FA1149b1C475TSK191032E/48288.pdf. Fecha de consulta: 5/2/2015.

5.- Bravo Rivera, G. (2012). Características de una tostada con maíz y alga Ulva clathrata. Tesis maestría. Instituto Politécnico Nacional. Disponible en: http://www.tesis.uchile.cl/tesis/uchile/2006/qf-gewerc_v/pdfAmont/qf-gewerc_v.pdf Fecha de consulta: 30/6/2013.

6.- Cano Mallo, C. (2008). Bases biológicas de Ulva fasciata Delile, (Chlorophyta) para su posible explotación, al oeste de La Habana, Cuba. Tesis de grado. Universidad de la Habana. Disponible en: http://www.oceandocs.org/bitstream/1834/3404/1/Tesis%20Doctorado%20Mercedes%20Cano%2008.pdf
Fecha de consulta: 5/2/2015.

7.- Castell Puchades, M. A.; Delgado Cobas, L.; Gomez Luna, L. M. (2013). Variaciones en la morfometría de Ulva lactuca L (Ulvophyceae) en dos zonas de la bahía de Santiago de cuba. Ciencia en su PC 3: 1-11. Disponible en: http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181330951001
Fecha de consulta: 5/2/2015.

8.- Castro González, M. I; Pérez Gil Romo, F.; Pérez Estrella S.; Carillo Dominguez S. (1996). Composición química del alga verde Ulva lactuca. Ciencias Marinas 22(2): 205-201. Diponible en:
http://biblat.unam.mx/pt/revista/ciencias-marinas/articulo/composicion-quimica-del-alga-verde-ulva-lactuca. Fecha de consulta: 30/4/2013.

9.- Chaverrías, M. (2009). Cultivos bajo el mar. Disponible en: http://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/sociedad-y-consumo/2009/10/28/188839.php. Fecha de consulta: 24/5/2014.

10.- Argentina. Código Alimentario Argentino. Ley 18.284. Articulo XI actualizado 06/2013. Disponible en: http://www.fcq.unc.edu.ar/sites/default/files/biblioteca/CAPITULO_XI_Vegetales.pdf Fecha de consulta: 6/2/2015.

11.- Coll, J. (1979). Catálogo de algas citado para el Uruguay. Montevideo, MDN. SOHMA, 173 p.

12.- Estevao Belchior S.; Gallardo, A. A.; Risso, S.; Fajardo, M. A. (2003). Evaluación microbiológica del alga comestible Porphyra columbina, Montagne, de la costa patagónica argentina. Revista FABICIB 7: 55-64. Disponible en: http://bibliotecavirtual.unl.edu.ar/ojs/index.php/FABICIB/article/view/718/989
Fecha de consulta: 15/8/2014.

13.- Etcheverry D. H. (1986). Algas Marinas Bentónicas de Chile. Montevideo, UNESCO, 379 p. Disponible en:

http://unesdoc.unesco.org/images/0007/000721/072123so.pdf Fecha de consulta: 4/2/2015.

14.- Gallardo, A. A.; Risso, S.; Fajardo, M. A.; Estevao Belchior S. (2004). Caracterización de poblaciones microbianas presentes en la macroalga comestible Monostroma undulatum, Wittrock. Disponible en: http://worldwidescience.org/topicpages/m/macroalga+comestible+monostroma.html. Fecha de consulta: 15/8/2014.

15.- Google Earth. Disponible en: http://earth.google.es/ Fecha de consulta: 25/11/15

16.- ICMSF-International Commission on Microbiological Specifications for Foods, of the International Union of Microbiogical Societies (1999). Microorganismos de los Alimentos 2, Métodos de muestreo para análisis microbiológicos: Principios y aplicaciones específicas. 2 ª ed. Zaragoza, Acribia, 260 p.

17.- ICMSF-International Commission on Microbiological Specifications for Foods, of the International Union of Microbiogical Societies (2002). Microorganisms in Foods 7, Microbiological Testing in food Safety Management. New York, Kluwer Academic/Plenum, 362 p.

18.- Karacalar, U.; Turan, G. (2008). Microbiological Assays on Edible Seaweed Ulva Lactuca (L.) Cultured in Outdoor Tanks. Journal of Applied Biological Sciences 2 (2):27-30. Disponible en: http://www.nobel.gen.tr/Makaleler/JABS-Issue%201-68-2011.pdf. Fecha de consulta: 15/8/2014.

19.- Méndez Lascano, H. (1982). Florula de Chlorophytas bentónicas de " La Paloma", Departamento de Rocha (ROU). Tesis. Facultad de Humanidades y Ciencias, UDELAR, 77 p.

20.- Mendez Valderrey J. L. "Ulva lactuca". Asturnatura.com Nº 1. 26/12/2004. Disponible en: http://www.asturnatura.com/especie/ulva-lactuca.html. Fecha de consulta: 8/10/2010.

21.- Peluffo E. (2005). Relevamiento de fauna y macroalgas de Cabo Polonio, Depto. de Rocha, Uruguay. Informe. Disponible en: http://es.calameo.com/read/000374705848b50190156 Fecha de consulta: 15/8/2015.

22.- FAO (2004).Puntos más salientes de los estudios especiales de la FAO. Disponible en: http://www.fao.org/docrep/007/y5600s/y5600s07.htm Fecha de consulta: 22/4/2015.

23.-