

# CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LA OSTRAS *Crassostrea rhizophorae* Y AGUAS DE EXTRACCIÓN, ESTADO SUCRE, VENEZUELA

## Microbiological Quality of the Oyster *Crassostrea rhizophorae* and Extraction Waters, Sucre State, Venezuela

Mayelys González<sup>1</sup>, Crucita Graü<sup>2</sup>, Luz Bettina Villalobos<sup>1</sup>, Humberto Gil<sup>2</sup> y Aleikar Vásquez-Suárez<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biología, Universidad de Oriente (UDO), Núcleo de Sucre.

<sup>2</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA-Sucre/Nva. Esparta).

<sup>3</sup>Centro de Investigaciones en Ciencias de la Salud, UDO, Núcleo de Anzoátegui. Fax: 0293-4323573.

E-mail: lbvillalobosb@yahoo.com

### RESUMEN

La ostra *Crassostrea rhizophorae* es consumida comúnmente en diversas playas del estado Sucre, sin conocer la carga microbiana que éstas presentan. Por tal motivo se evaluó la calidad microbiológica de la misma y de muestras de agua proveniente de tres estaciones del banco natural de Laguna Grande del Obispo, con el propósito de verificar el cumplimiento de los requisitos microbiológicos establecidos por la Legislación Sanitaria Venezolana y la Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos (FDA). Se realizaron muestreos mensuales entre agosto 2005 y julio 2006, determinándose el NMP/100 mL de coliformes totales (CT) y coliformes fecales (CF) en muestras de agua, mientras que en los bivalvos se cuantificó el NMP de CT, CF y *Escherichia coli* (EC) por gramo de ostra, además de la detección de *Salmonella* spp. Los resultados obtenidos de CT y CF en muestras de agua de las tres estaciones, cumplieron en la mayoría de los meses, con las exigencias permitidas (70 NMP/100 mL de CT y 14 NMP/100 mL de CF). Durante los meses de muestreo y entre las estaciones analizadas, se observaron variaciones considerables en los valores de CF y EC que estuvieron entre 0 y  $2,4 \times 10^4$  NMP/g de ostra. Los límites permitidos de CF y EC (230 NMP/g de ostra) fueron excedidos por los CF en todas las estaciones durante agosto y diciembre 2005, y también en marzo, mayo y junio 2006, mientras que los de EC se excedieron sólo en diciembre 2005, y marzo y mayo 2006. *Salmonella* spp. fue detectada en la primera y segunda estación para el mes de septiembre 2005, en la tercera estación para el mes de diciembre del mismo año y en la segunda y tercera esta-

ción, para los meses de mayo y julio 2006. Los resultados obtenidos reflejan un alto riesgo de consumir estos moluscos sin haber sido previamente sometidos a una depuración.

**Palabras clave:** *Crassostrea rhizophorae*, banco natural, coliformes fecales, *Escherichia coli*.

### ABSTRACT

In beaches of Sucre State commonly the oyster *Crassostrea rhizophorae* is consumed without knowing the microbial load microbial that may be presenting. For such motive, the microbiology quality of *C. rhizophorae* and water samples of three stations from natural bank in Laguna Grande of Obispo was evaluated, to check the compliance of microbiological requirements established by the Food and Drugs Administration of United States (FDA) and Sanitary Venezuelan Legislation. Monthly samplings between August 2005 and July 2006 was realized, determining the MPN/100 mL of coliforms totals (TC) and faecal coliforms (FC) in water samples, whereas in bivalves MPN of TC, FC and *Escherichia coli* (EC) was quantified for gram of oyster, further to detection *Salmonella* spp. The results obtained of TC and FC, in water samples of the three stations, fulfilled in majority of the months, with the requirements mentioned above. During the months sampling and between analyzed stations, considerable variations was observed in values of FC and EC that were between 0 and  $2.4 \times 10^4$  MPN/g oyster. The limits allowed for FC and EC (230 MPN/g oyster) were exceeded by the FC on all stations during August, December 2005, and also in March, May and June 2006, whereas EC exceeded only in December 2005, and March and May 2006. *Salmonella* spp. was detected on first and second station in September 2005, on the third station for

December of the same year, and second and third station for May and July 2006. The obtained results reflect high risk of consuming these mollusks without having being before submitted to depuration.

**Key words:** *Crassostrea rhizophorae*, natural bank, faecals coliforms, *Escherichia coli*.

## INTRODUCCIÓN

La contaminación de sistemas acuáticos naturales por el vertido de aguas residuales domésticas y urbanas representa una de las principales causas de pérdida de calidad ambiental de los ríos, estuarios y las aguas costeras en general. La gestión correcta de éste y otros problemas sólo puede abordarse tras el conocimiento de la identidad e importancia de las fuentes contaminantes descargadas en el sistema receptor. Las aguas residuales domésticas pueden contener gran diversidad de agentes contaminantes de naturaleza química, capaces de provocar cambios importantes en los ecosistemas locales, así como numerosos microorganismos patógenos (bacterias, virus), de efectos indeseables sobre la salud. Por lo tanto, evaluar la calidad de las aguas y su grado de contaminación por materia fecal es una labor de importancia por razones de tipo ecológico, sanitario y estético.

La ostra *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) es típica de lagunas costeras del Caribe y Brasil, su hábitat son las raíces del mangle rojo *Rhizophorae mangle*, a las cuales se fija permanentemente formando racimos. Está presente en la zona intermareal, aunque pueden encontrarse hasta unos 3 m de profundidad. Se reproduce durante todo el año, pero con mayor intensidad desde junio hasta mediados de diciembre, coincidiendo con el aumento de la temperatura del agua, factor que, con la disponibilidad de alimento, parece regular la reproducción [17]. En Venezuela se encuentra ampliamente distribuida en la costa centro-oriental, formando numerosos bancos naturales de importancia comercial, entre los cuales podemos mencionar el Parque Nacional Morrocoy y el Refugio de Fauna Silvestre Cuare, estado Falcón, Parque Nacional Laguna la Restinga, Isla de Margarita y la Bahía de Mochima y Laguna Grande del Obispo en el estado Sucre en la que se han estimado producciones hasta los 2,3 kg.m<sup>-2</sup>.año<sup>-1</sup> [32].

La comercialización de este molusco bivalvo se ha venido realizando en las playas con mayor potencial turístico del país, ofreciéndoselas al turista o visitante, cruda, directamente en la concha. Se dispone de poca información sobre la comercialización de este rubro pesquero de gran importancia económica y no se tienen cifras oficiales sobre la administración, producción y comercialización del mismo, a pesar de ser considerado un recurso alimenticio y sustento económico importante para las poblaciones costeras de la zona donde se encuentra. Gil y Moreno [16] realizaron un estudio sobre la explotación y comercialización de *C. rhizophorae* en algunas playas turísticas del estado Sucre, reportando que Laguna Grande re-

presenta uno de los principales puntos para la extracción de la ostra. Además reportan que esta explotación se lleva a cabo desde hace más de tres décadas y se realiza durante todo el año con el fin de comercializarla en Playa Colorada, Playa San Luís (Hotel Cumanagoto, Los Bordones, Casino Militar y Colegio de Médicos), Playa Quetepe (Balneario Quetepe) y Bahía Mochima (Playa Blanca, Las Maritas y Poblado de Mochima), principalmente en los días festivos o temporadas vacacionales. Lodeiros y col. [23], también señalan que la comercialización se realiza en zonas turísticas por un número de personas que la sustraen de los manglares, siendo esta actividad la que sostiene económicamente al grupo familiar. Así mismo, la explotación continúa sin control efectivo, ha ocasionado bajas considerables en la densidad poblacional del molusco en Laguna Grande. Para el transporte, comercialización y consumo del bivalvo es un requisito indispensable la realización de pruebas microbiológicas y toxicológicas. En la actualidad se desconoce la existencia de un control sanitario permanente por parte de autoridades de salud pública, que garanticen la inocuidad del producto a fin de disminuir los riesgos de contraer enfermedades gastrointestinales.

Entre las bacterias que se han utilizado como indicadores de contaminación fecal en moluscos se incluyen los coliformes totales (CT), coliformes fecales (CF), *E. coli* y *Salmonella*; esta última ha sido considerada como uno de los patógenos más temidos en alimentos, dada su virulencia y habilidad para sobrevivir a condiciones de estrés. Por tanto, de adaptarse al mar, le permitiría mantener sus características virulentas, lo cual conlleva a alertar sobre el riesgo de su transmisión a través de productos marinos, especialmente moluscos, que generalmente son consumidos crudos o semicrudos y que por su capacidad de filtración son capaces de concentrar microorganismos hasta niveles que permitan alcanzar dosis infecciosas.

Bajo esta argumentación, se llevó a cabo un estudio bacteriológico de la ostra de mangle *C. rhizophorae* y del cuerpo de agua donde ésta se desarrolla en Laguna Grande del Obispo, en la costa norte del Golfo de Cariaco, a fin de evaluar la condición sanitaria del bivalvo mayoritariamente distribuido en las playas de interés turístico del estado Sucre.

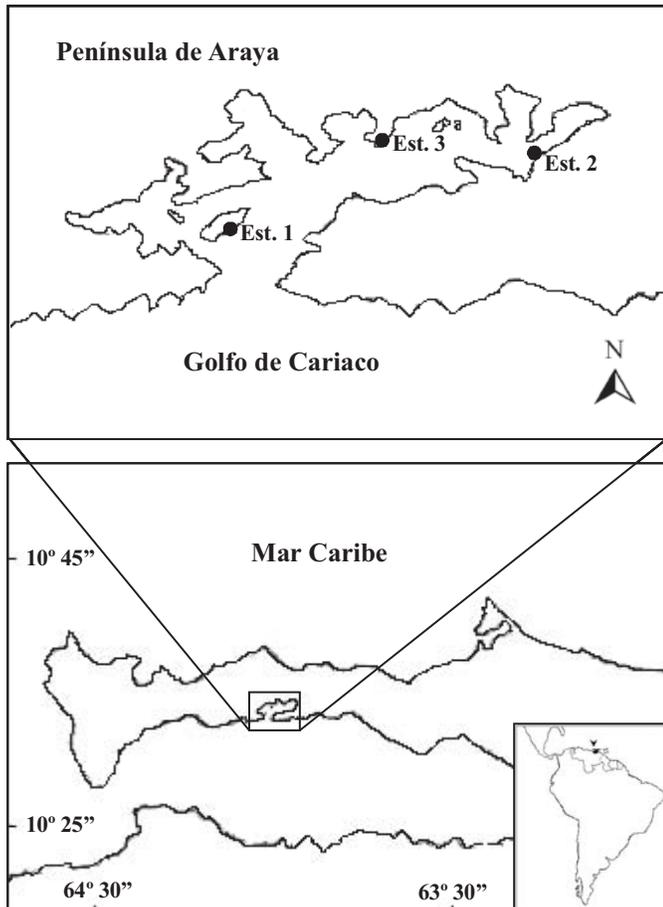
## MATERIALES Y MÉTODOS

### Recolección y preparación de las muestras

Entre agosto 2005 y julio 2006 se colectaron mensualmente muestras de agua y de ejemplares de *C. rhizophorae* en tres estaciones del banco natural de Laguna Grande del Obispo. Estas áreas están ubicadas en la región centro-occidental de la costa sur de la Península de Araya, al noreste del Golfo de Cariaco, estado Sucre, Venezuela (FIG. 1).

### Agua

Se tomaron muestras de agua (500 mL por estación), utilizando botellas de vidrio, previamente esterilizadas. Dichas



**FIGURA 1. ÁREAS DE PROCEDENCIA DE LAS MUESTRAS DE AGUA Y DE *Crassostrea rhizophorae* / ORIGINATING AREA OF *Crassostrea rhizophorae* AND WATER SAMPLES.**

botellas fueron sumergidas en el agua, a una profundidad aproximada de 30 cm por debajo de la superficie dentro de la zona de crecimiento de la ostra. Una vez colectadas, fueron transportadas en una cava con hielo hasta el laboratorio de Microbiología del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA Sucre/Nva. Esparta) para realizarle los análisis microbiológicos.

**Moluscos**

Fueron colectados directamente en las raíces de mangles en distintas zonas de crecimiento del bivalvo (*C. rhizophorae*) y se colocaron dentro de bolsas plásticas con cierre hermético previamente rotuladas. Las muestras se transportaron en una cava con hielo hasta el laboratorio para los análisis respectivos.

Las ostras fueron desbulladas bajo estrictas condiciones de asepsia, de acuerdo a la metodología recomendada por Miescer y col. [28]. En cuanto a la preparación de las mismas para los análisis microbiológicos, se siguieron las pautas de la norma Venezolana COVENIN [7].

**Análisis microbiológicos**

**Determinación de coliformes totales y coliformes fecales en el agua donde crece la ostra *C. rhizophorae*.** Para esta prueba se llevó a cabo la metodología recomendada por la APHA [1] utilizando cinco tubos por dilución.

**Determinación de coliformes totales, coliformes fecales y *E. coli* en muestras de *C. rhizophorae*.** Se realizó por medio de la técnica de fermentación de tubos múltiples con caldo Lauryl Sulfato Triptosa (Merck) de acuerdo a las recomendaciones de Miescer y col. [28] y COVENIN [6]. El número de tubos confirmados como positivos se comparó con la tabla de la APHA [1] y los resultados fueron expresados como número más probable (NMP) de bacterias coliformes totales por gramo de ostra.

Para diferenciar los CF, se procedió a tomar una asada de los tubos con gas en caldo Lauryl Sulfato Triptosa para inocular tubos con 10 mL de caldo para *E. coli* (EC, Merck) y un tubo Durham. Los resultados fueron llevados a la tabla de APHA [1] para expresarlos como NMP de bacterias CF por gramo. Para determinar el NMP de *E. coli* se sembró por estría, a partir de los tubos positivos con gas del caldo EC, placas con agar Levine Eosina-Azul de Metileno (EMB, Merck). Posterior al tiempo de incubación (Incubadora Memmert - UNB 400, Alemania), se relacionaron aquellos tubos con caldo EC (Merck) que resultaron positivos con el número de placas de agar Levine EMB que resultaron positivas para *E. coli* y los resultados fueron llevados a la tabla de la APHA [1] para ser expresados en NMP de *E. coli*/g de alimento. Luego, a partir de las placas positivas, se aisló en agar nutritivo inclinado colonias morfológicamente distintas, para la obtención de cultivos puros. A las colonias aisladas y purificadas se les realizaron tinciones de Gram y las pruebas bioquímicas recomendadas por MaC Faddin [24] y Merck [27].

**Detección del género bacteriano *Salmonella* spp. en *C. rhizophorae*.** Para la detección de este género bacteriano se utilizó la metodología descrita por COVENIN [8] y Merck [27].

**Análisis estadísticos**

Los datos obtenidos fueron promediados de acuerdo a cada tratamiento a fin de aplicar la prueba no paramétrica de rangos Kruskal-Wallis (KW) para determinar si existían diferencias significativas ( $\alpha = 0,05$ ) en el recuento bacteriano por meses y estaciones.

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

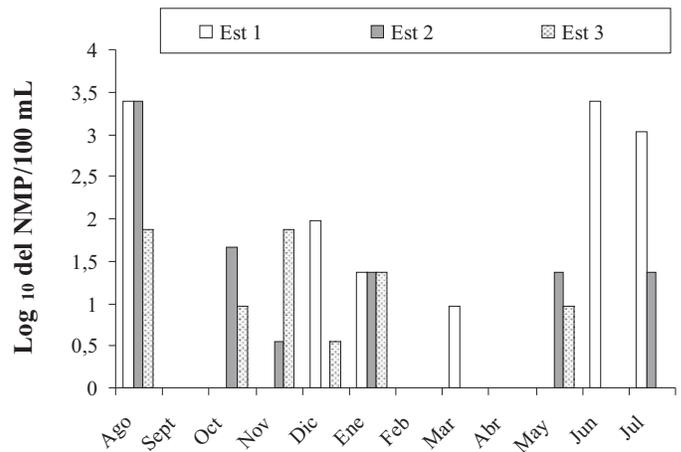
La distribución del NMP de CT por 100 mL de muestra de agua tuvo un margen de variación entre 0 y  $2,4 \times 10^3$  (FIG. 2), siendo la estación 1, la que presentó los mayores valores durante el primer y el penúltimo mes de muestreo. Concentraciones similares de este grupo bacteriano fueron encontradas en las muestras de agua de la estación 2, al inicio del

estudio. En los meses de septiembre 2005, febrero y abril 2006, no se determinaron CT en ninguna de las estaciones. Tampoco en las muestras de agua de la estación 1 durante los meses de octubre y noviembre 2005 y mayo 2006; en la estación 2, durante diciembre 2005 y marzo y junio 2006, mientras que en aguas de la estación 3 colectadas en los meses de marzo, junio y julio 2006, tampoco se aislaron estas bacterias. A pesar de las variaciones en el número de CT en las muestras de agua analizadas no se encontraron diferencias significativas (KW:  $P>0,05$ ) para esta variable durante los meses de estudio, ni entre las estaciones de muestreo.

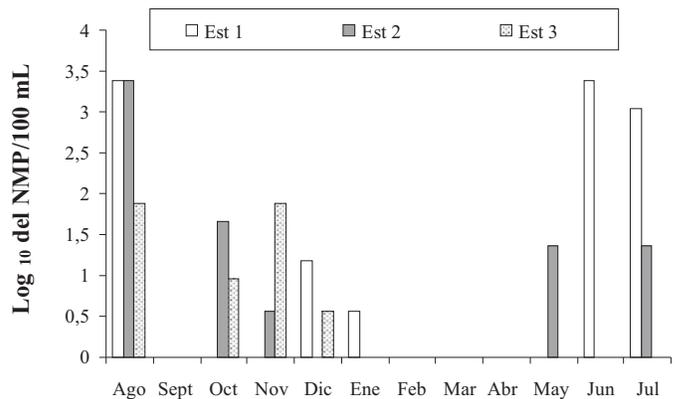
Igualmente, los valores del NMP de CF por cada 100 mL de agua (FIG. 3) presentaron un margen de variación entre  $(0-2,4 \times 10^3)$ . Durante los meses de agosto 2005 y junio 2006, el agua colectada en la estación 1 mostró las mayores concentraciones de CF ( $2,4 \times 10^3$  NMP/100 mL), valores similares fueron encontrados en el agua analizada de la estación 2 durante el primer mes de muestreo, mientras que durante los meses de septiembre 2005, febrero, marzo y abril 2006, en las muestras de agua de las diferentes estaciones no se detectaron estos microorganismos. De igual forma, en la estación 1, durante los meses de octubre, noviembre 2005 y mayo 2006; en diciembre 2005, enero y junio 2006 en la estación 2, ni durante enero, mayo, junio y julio 2006 de la estación 3, se evidenció la presencia de este grupo bacteriano. Las concentraciones de CF determinadas en las tres estaciones se presentaron de la siguiente manera: en la estación 1 y 2 de  $0-2,4 \times 10^3$  NMP/100 mL y por último, en la estación 3 de  $0-7,5 \times 10$  NMP/100 mL. La prueba estadística Kruskal-Wallis no permitió la observación de diferencias significativas (KW:  $P>0,05$ ) entre las estaciones de muestreo ni tampoco entre los meses estudiados para esta variable.

La distribución del NMP de CT por gramo de ostra se muestra en la FIG. 4. Los valores obtenidos en las ostras de la estación 1, 2 y 3 oscilaron entre  $3,6 \times 10 - 2,4 \times 10^4$ ;  $3,9 \times 10^2 - 2,4 \times 10^4$  y  $9,3 \times 10^2 - 2,4 \times 10^4$ , respectivamente. A pesar de esas diferencias numéricas, durante todos los meses, con excepción de noviembre 2005 en la estación 1, se detectaron valores relativamente elevados en las ostras de las tres estaciones. A pesar de las variaciones en los valores de este grupo bacteriano, no se observaron diferencias significativas (KW:  $P>0,05$ ) entre las estaciones de muestreo ni entre los meses analizados.

Por otra parte, el NMP de CF por gramo de ostra (FIG. 5) presentó valores que oscilaron entre  $3,6 \times 10 - 2,4 \times 10^4$  en la estación 1, mientras que en las estaciones 2 y 3 se obtuvieron entre 0 y  $2,4 \times 10^4$  CF. Este grupo bacteriano estuvo presente durante casi todos los meses muestreados, excepto en septiembre 2005 y julio 2006 en las estaciones 2 y 3. Los valores máximos de CF/g ostra, se evidenciaron durante agosto 2005 para la estación 1 y 3; en septiembre y diciembre 2005, así como en enero 2006 sólo en la estación 1; en mayo 2006 para las tres estaciones y junio 2006 sólo en la estación 3. Mientras que los valores más bajos fueron en septiembre 2005 y julio 2006 en las estaciones 2 y 3. No se evidenciaron dife-



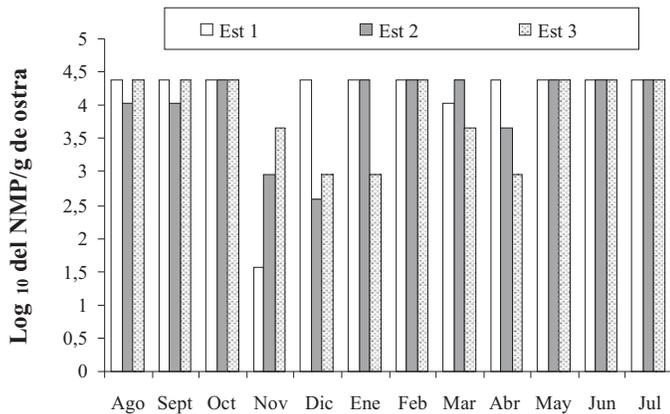
**FIGURA 2. DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES (NMP/100 mL) EN MUESTRAS DE AGUA PROCEDENTES DE TRES ESTACIONES EN LAGUNA GRANDE DEL OBISPO ENTRE AGOSTO DE 2005 Y JULIO DE 2006 / MOST PROBABLE NUMBER (MPN/100 mL) OF TOTAL COLIFORM IN WATER SAMPLES ORIGINATING FROM THREE STATIONS AT LAGUNA GRANDE OF THE OBISPO BETWEEN AUGUST 2005 AND JULY 2006.**



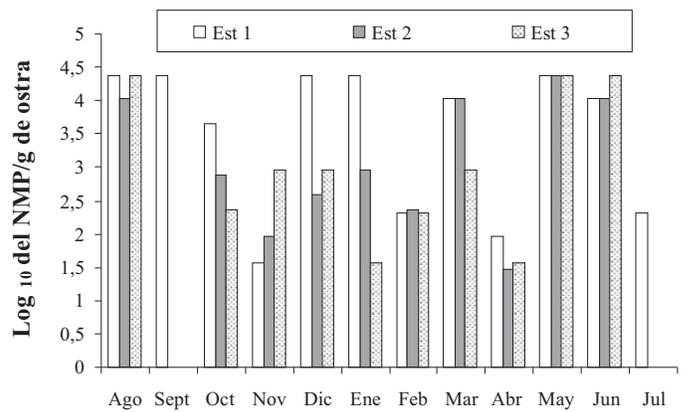
**FIGURA 3. DETERMINACIÓN DE COLIFORMES FECALES (NMP/100 mL) EN MUESTRAS DE AGUA PROCEDENTES DE TRES ESTACIONES EN LAGUNA GRANDE DEL OBISPO ENTRE AGOSTO DE 2005 Y JULIO DE 2006 / MOST PROBABLE NUMBER (MPN/100 mL) OF FAECAL COLIFORM IN WATER SAMPLES ORIGINATING FROM THREE STATIONS AT LAGUNA GRANDE OF THE OBISPO BETWEEN AUGUST 2005 AND JULY 2006.**

rencias significativas (KW:  $P>0,05$ ) entre las estaciones de muestreo para la variable mencionada, pero sí entre los meses analizados.

La distribución del NMP de *E. coli* por gramos de ostra (FIG. 6) presentó el mismo margen de variación observado en los CF para las tres estaciones estudiadas, en donde los valores máximos se obtuvieron en los meses de septiembre y diciembre 2005, enero y mayo 2006, para la estación 1; mientras que en las estaciones 2 y 3, los máximos valores sólo se obtuvieron en el mes de mayo 2006. Por otro lado, en las os-



**FIGURA 4. DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES (NMP/g) EN *Crassostrea rhizophorae* DE TRES ESTACIONES EN LAGUNA GRANDE DEL OBISPO ENTRE AGOSTO DE 2005 Y JULIO DE 2006 / MOST PROBABLE NUMBER (MPN/g) OF TOTAL COLIFORM IN *Crassostrea rhizophorae* SAMPLES ORIGINATING FROM THREE STATIONS AT LAGUNA GRANDE OF THE OBISPO BETWEEN AUGUST 2005 AND JULY 2006.**

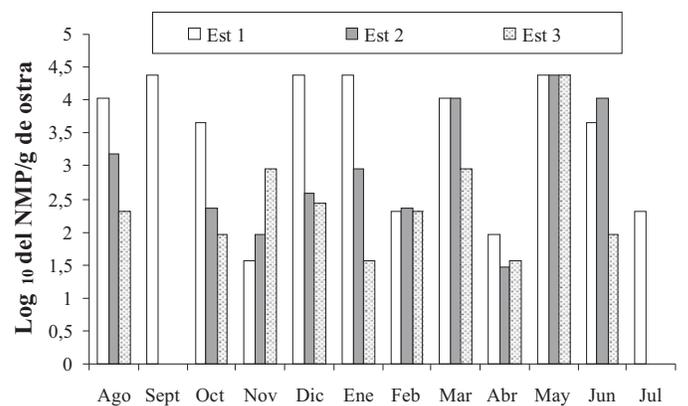


**FIGURA 5. DETERMINACIÓN DE COLIFORMES FECALES (NMP/g) EN *Crassostrea rhizophorae* DE TRES ESTACIONES EN LAGUNA GRANDE DEL OBISPO ENTRE AGOSTO DE 2005 Y JULIO DE 2006 / MOST PROBABLE NUMBER (NMP/g) OF FAECAL COLIFORM IN *Crassostrea rhizophorae* SAMPLES ORIGINATING FROM THREE STATIONS AT LAGUNA GRANDE OF THE OBISPO BETWEEN AUGUST 2005 AND JULY 2006.**

tras colectadas en las últimas estaciones mencionadas no se detectó la presencia de *E. coli* durante los meses de septiembre 2005 y julio 2006. Los valores del NMP de *E. coli* por gramo de ostra, no presentaron diferencias significativas (KW:  $P > 0,05$ ) entre las estaciones de muestreo ni entre los meses estudiados.

La FDA [13] en concordancia con lo establecido en la Gaceta Oficial N° 5.021 [31] de la clasificación de aguas tipo 3: aguas marinas o medios costeros destinados a la cría y explotación de moluscos consumidos en crudo, especifica que los CT y CF no deben exceder de 70 ( $\text{Log}_{10} = 1,84$ ) y 14 ( $\text{Log}_{10} = 1,15$ ) NMP/100 mL, respectivamente, permitiendo la presencia del mencionado grupo bacteriano en muestras de agua de mar, hasta un máximo de 10% con respecto al total analizado.

Los resultados obtenidos de CT y CF en las muestras de agua de las tres estaciones estudiadas incumplieron la norma antes mencionada, ya que en el agua proveniente de la estación 1, se registraron valores que sobrepasaron los límites, tanto en CT como CF, durante los meses de agosto, diciembre 2005, junio y julio 2006 (33,33% de las muestras). En la estación 2 se observó un aumento de CT sólo para el mes de agosto 2005 (8,33%), mientras que en CF los valores fueron relativamente elevados durante los meses de agosto, octubre 2005, mayo y julio 2006 (33,33% de las muestras). En el caso de la estación 3, los valores máximos de ambos grupos bacterianos, se evidenciaron para el mes de agosto y noviembre 2005, mostrando un 16,67% de las muestras. Es posible que el alto índice de coliformes encontrados en estas zonas y para estos meses, en particular los fecales, sea indicativo de que el área estaba siendo contaminada en el momento de la toma de las muestras, ya que como señalan Iriarte y Rengel [21], la supervivencia de los CF en el agua es más corta que la de los CT. Además, se puede señalar que las elevadas concentracio-



**FIGURA 6. DETERMINACIÓN DE *Escherichia coli* (NMP/g) EN *Crassostrea rhizophorae* DE TRES ESTACIONES EN LAGUNA GRANDE DEL OBISPO ENTRE AGOSTO DE 2005 Y JULIO DE 2006 / MOST PROBABLE NUMBER (NMP/g) OF *Escherichia coli* IN *Crassostrea rhizophorae* SAMPLES ORIGINATING FROM THREE STATIONS AT LAGUNA GRANDE OF THE OBISPO BETWEEN AUGUST 2005 AND JULY 2006.**

nes de CT pudiera atribuirse al aporte de bacterias procedentes de los residuales domésticos de las comunidades locales y a las precipitaciones que arrastran bacterias y materia orgánica, estos factores además de incrementar la población bacteriana en el agua favorecen su supervivencia [11].

Los valores bajos o la no detección de CT en las diferentes estaciones durante algunos meses, pudiera ser consecuencia de la menor emisión de desechos y a la periodicidad con la que son emitidos, al efecto de dilución que sufre el efluente en la masa de agua y al grado de supervivencia de los CT en ambientes marinos, el cual se ve afectada por la presencia de bacteriofagos, salinidad, luz solar y elevadas concentraciones de metales pesados [9].

De acuerdo a lo establecido por el Ministerio de Agricultura y Cría [29] en las providencias administrativas N° 03 y 04 y en concordancia con lo ordenado por la FDA [14], los moluscos bivalvos no deben sobrepasar los 3,0 ( $\text{Log}_{10} = 0,48$ ) y 2,3 ( $\text{Log}_{10} = 0,36$ ) NMP/g de CF y *E. coli*, respectivamente. En la presente investigación, el NMP de estos grupos bacterianos por gramo de ostra procedente de las tres estaciones, presentaron en su mayoría valores por encima del límite establecido. Los valores de CF (FIG. 5) y *E. coli* (FIG. 6) en la estación 1 incumplieron durante todo el tiempo de muestreo con la normativa antes señalada, comportamiento similar de estos grupos bacterianos fue observado en las estaciones 2 y 3, los cuales, también sobrepasaron los límites permitidos durante todo el año, con excepción de los meses de septiembre 2005 y julio 2006. En términos porcentuales, las tres estaciones presentaron valores relativamente elevados, siendo la estación 3 la que presentó el mínimo número de muestras que excedieran los valores permitidos con 50 y 33,33% para CF y *E. coli*, respectivamente.

Esto concuerda con los resultados obtenidos en las muestras de agua y permite inferir que el molusco se está cosechando en aguas con una probable contaminación fecal directa [20, 21]. Los resultados obtenidos son similares a los encontrados por Sarcos y Botero [35], quienes reportan en *Polymesoda solida* que el 75% de las muestras sobrepasaron los límites para CF y el 50% para *E. coli*. Por otro lado, en esta investigación los valores de coliformes fecales fueron relativamente altos en comparación con los encontrados por Silva y col. [36], quienes realizaron un estudio de la ostra *Crassostrea rhizophorae* en el estuario río Cocó, estado Ceará, Brasil. Igualmente, Pereira y col. [30] en *Crassostrea gigas* de la Costa de Florianópolis, Brasil.

El hecho de que exista un alto índice de estos grupos bacterianos, indicadores de contaminación fecal en las ostras, puede ser atribuido a que estas zonas están siendo afectadas por aguas residuales de las poblaciones cercanas. Estos altos valores también pudieran estar relacionados con la capacidad concentradora de los moluscos bivalvos al filtrar partículas, una posible relación estacional entre los parámetros ambientales (principalmente temperatura y salinidad), al aumento del volumen de agua por efecto de las lluvias y vertidos, y/o a la influencia de las corrientes. Factores que inciden en un intercambio pronunciado entre el cuerpo de agua, los sedimentos con grandes contenidos de materia orgánica y los microorganismos que se distribuyen con mayor homogeneidad en la columna de agua [18].

Debido a que las ostras son frecuentemente consumidas crudas, es posible que dichos bivalvos sean portadores de *E. coli*, que además de ser considerada indicadora de contaminación fecal, presenta diversidad de cepas o serogrupos potencialmente patógenos, capaces de producir enfermedades tales como colitis hemorrágica y síndrome hemolítico urémico, por lo tanto, el consumo de ostras crudas posee un alto riesgo a la salud del consumidor [15, 22].

Tomando en cuenta los altos valores de CF, tanto en las ostras como en el agua donde éstas se cultivan, podría esperarse la presencia de *Salmonella* en la mayor parte de las muestras; sin embargo, en esta investigación sólo se detectó *Salmonella* spp. en la estación 1 en septiembre 2005; en la estación 2 durante septiembre 2005, mayo y julio 2006, y en la estación 3 en diciembre 2005, mayo y julio 2006.

El género *Salmonella* es uno de los patógenos más temidos en alimentos marinos, dada su virulencia y habilidad para sobrevivir en gran variedad de condiciones de estrés por largos períodos de tiempo. Comprende más de 2.400 serotipos, los cuales son considerados patógenos potenciales de humanos, pero sólo un número reducido de serotipos han sido asociados con infecciones humanas [2]. Generalmente se vincula con alimentos crudos, especialmente aquellos de origen animal, y contaminación cruzada de productos alimenticios preparados, los cuales son el vehículo principal de salmonelosis [5]. Según Martínez y col. [25], la presencia de *Salmonella* en sistemas acuáticos se atribuye a las descargas de aguas residuales urbanas, agrícolas y residuales en zonas costeras, las cuales representan un foco de contaminación permanente. Además, eventos climáticos como lluvias y tormentas generan escorrentías que transportan bacterias entéricas desde su reservorio hasta la costa, contaminando así los organismos que allí se desarrollan [3].

La sobrevivencia de *Salmonella*, así como de otros patógenos entéricos en el mar, se debe a que es capaz de entrar en un estado viable pero no cultivable al encontrarse bajo condiciones ambientales drásticas propias del ambiente marino [26, 33, 34], lo que dificulta su recuperación de estos ambientes. Por ello, cuando se toma en consideración estas condiciones de estrés propias de ambientes naturales en los diferentes métodos que existen para su detección y aislamiento se obtienen mejores resultados, es decir, se aíslan un mayor número de estirpes de *Salmonella* en comparación a aquellos métodos tradicionales empleados en el diagnóstico clínico [37].

Actualmente se emplean técnicas moleculares para su detección en el medio acuático pero con la limitación de no determinar su real potencial patogénico [10]. Así mismo se disponen de técnicas de aislamiento diferentes a las usadas en la práctica clínica, las que consideran las condiciones de estrés ambiental, como la acción del pH, salinidad, temperatura, etc. [19]. *Salmonella*, al adaptarse en el mar, podría mantener sus características virulentas lo que permite alertar sobre el riesgo de su transmisión a través de productos marinos, especialmente moluscos, que generalmente son consumidos crudos o semicrudos y que por su capacidad de filtración son capaces de concentrar los microorganismos hasta niveles que puedan alcanzar una dosis infecciosa. El hallazgo de *Salmonella* en ostras ha sido ya previamente reportado utilizando técnicas de biología molecular como el PCR (del inglés Polymerase Chain Reaction) y métodos convencionales de aislamiento [4].

Cabe destacar que a través de la metodología utilizada para el aislamiento de esta bacteria se recuperaron diferentes miembros de la familia Enterobacteriaceae, entre los cuales se encuentra *Serratia* spp., *Serratia rubidaea*, *Proteus* spp., *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae* y *Enterobacter intermedium*. Estos resultados difieren de los observados por Fontáñez [12], quien realizó un estudio en Puerto Rico con *Lucina pectinata* y *C. rhizophorae*, y señaló que *Salmonella* debió estar presente en niveles tan bajos que el método utilizado no fue capaz de detectarla o que se encontraba en estado viable no cultivable.

## CONCLUSIONES

Los resultados de las determinaciones de CT y CF (NMP/100 mL) en muestras de agua de las tres estaciones analizadas excedieron considerablemente los límites establecidos por la FDA y las normas venezolanas, publicadas en la Gaceta Oficial Nº 5021, referida al uso de aguas costeras como áreas para el cultivo y explotación de moluscos de consumo en crudo.

Las ostras procedentes de las tres estaciones presentaron en más del 10% de las muestras, valores (NMP/g ostra) por encima de los límites establecidos por la Legislación Sanitaria Venezolana y la FDA para los niveles de coliformes fecales y de *E. coli*. Por lo que su consumo en crudo, sin un proceso de depuración previo, representa un alto riesgo para el humano en la adquisición de algún tipo de enfermedad de transmisión alimentaria.

La presencia de *Salmonella* spp. en algunas de las muestras indica la variabilidad de la calidad microbiológica de la ostra *C. rhizophorae* que crece en la Laguna Grande del Obispo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Standard Methods for the examination of water and wastewater**. 18<sup>th</sup> Ed. American Water Works Association (AWWA). Washington, D.C., USA. 1015 pp. 1992.
- [2] BAGGESEN, D.; SANDVANG, D.; AARESTRUP, F. Characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 isolated from Denmark and comparison with isolates from Europe and the United States. **J. Clin. Microbiol.** 38:1581-1586. 2000.
- [3] BAUDART, J.; LEMARCHAND, K.; BRISABOIS, A.; LEBARON, P. Diversity of *Salmonella* strains isolated from the aquatic environment as determined by serotyping and amplification of the ribosomal DNA spacer regions. **Appl. Environ. Microbiol.** 66:1544-552. 2000.
- [4] BEJ, A.K.; MAHBUBANI, M.H.; BOYCE, M.J.; ATLAS, R.M. Detection of *Salmonella* spp. in oyster by PCR. **Appl. Environ. Microbiol.** 60:368-373. 1994.
- [5] BELL, C.; KYRIAKIDES, A. **Salmonella. A practical approach to the organism and its control in foods**. Practical Food Microbiology series. Blackwell Science Ltd., Oxford, United Kingdom. 330 pp. 2002.
- [6] COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). Norma COVENIN: 1104-96. Alimentos. Determinación del número más probable de coliformes, coliformes fecales y de *E. coli*. 2da Rev. Comisión Venezolana de Normas Industriales. Ministerio de Fomento. Caracas, Venezuela. 12 pp. 1996.
- [7] COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). Norma COVENIN: 1126-89. Alimentos. Codificación y preparación de muestras para el análisis microbiológico. Comisión Venezolana de Normas Industriales. 1<sup>a</sup> Rev. Ministerio de Fomento. Caracas, Venezuela. 7 pp. 1989.
- [8] COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). Norma COVENIN: 1291-88. Aislamiento e identificación de *Salmonella*. 1<sup>era</sup> Rev. Comisión Venezolana de Normas Industriales. Ministerio de Fomento. Caracas, Venezuela. 1988.
- [9] DAVIES, R.; BELL, R.; DONNINSON, A. Sunlight inactivation of enterococci and fecal coliforms in seawater. **Appl. Environ. Microbiol.** 61(5):1888-1896. 1994.
- [10] DUPRAY, E.; CAPRAIS, M.P.; DERRIEN, A.; FACH, P. *Salmonella* DNA persistence in natural seawaters using PCR analysis. **J. Appl. Microbiol.** 82:507-510. 1997.
- [11] FERGUNSON, C.; COOTE, B.; ASHBOLT, N.; STEVENSON, I. Relationships between indicators pathogens and water quality in an estuarine system. **Water Res.** 30(19):2045-2054. 1966.
- [12] FONTÁNEZ, Y. Determinación del perfil microbiológico de la almeja (*Lucina pectinata* Gmelin, 1791), del ostión de mangle (*Crassostrea rhizophorae* Guilding, 1828) y las aguas de extracción de bivalvos en la zona suroeste de Puerto Rico. Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayagüez. Tesis de Maestría. 83 pp. 2005.
- [13] FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (F.D.A). **Sanitation of shellfish growing areas. National Shellfish Sanitation Program**. Manual of operations. Part. I. U.S. Dept. of Health and Human Services. Public Health Service. Food and Drug Administration, Washington, D.C., U.S.A. 45 pp.1990a.
- [14] FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (F.D.A). **Sanitation of the harvesting, processing and distribution of shellfish**. National Shellfish Sanitation Program. Manual of operations. Part. II. Dep. of Health and Human Services. Public Health Service. Food and Drug Administration, Washington, D.C., U.S.A. 40 pp. 1990b.
- [15] FRAZIER, W.C. Alimentos y Microorganismos. En: Frazier, W.C. and Westhoff, D.C. (Eds.). **Microbiología de los alimentos**. 4<sup>ta</sup> Ed. Acribia, Zaragoza. 681 pp. 1993.

- [16] GIL, H.; MORENO, M. Explotación y comercialización de la ostra de mangle, *Crassostrea rhizophorae*, en algunas playas turísticas del estado Sucre, Venezuela. **Zoot. Trop.** 25(3):215-219. 2007.
- [17] GÓMEZ, A. *Crassostrea rhizophorae*. **Los recursos marinos renovables del Estado Nueva Esparta Venezuela**. Organizaciones Gráficas Capriles, C.A. Caracas Venezuela. 208 pp. 1999.
- [18] GRAÜ DE M, C.; LA BARBERA, A.; ZERPA, A.; SILVA, S.; GALLARDO, O. Aislamiento de *Vibrio* spp. y evaluación de la condición sanitaria de los moluscos bivalvos *Arca zebra* y *Perna perna* procedentes de la costa nororiental del estado Sucre, Venezuela. **Rev. Científ. FCV-LUZ**. XIV(6):513-521. 2004.
- [19] HOORFAR, J.; BAGGESEN, D. Importance of pre-enrichment media for isolation of *Salmonella* spp. from swine and poultry. **FEMS Microbiol. Lett.** 169:125-130. 1998.
- [20] IRIARTE, M. Indicadores bacterianos en las aguas y en el guacuco (*Tivela mactroides*) de la Ensenada de La Guardia, Isla de Margarita. **Mem. Fund. La Salle de Cienc. Nat.** 151:85-94. 1999.
- [21] IRIARTE, M.; RENGEL, A. Bacterias indicadoras de calidad sanitaria en la ostra de mangle *Crassostrea rhizophorae* y en el agua de la Laguna de Las Marites, Isla de Margarita, Venezuela. **Mem. Soc. Cienc. Nat. La Salle**. 57(147): 93-108. 1997.
- [22] JAY, J. M. Food Microbiology. **Modern Food Microbiology**. 6<sup>ta</sup> Ed. Aspen Publishers. Pp 720. 2000.
- [23] LODEIROS, C.; ALIO, J.; MARCANO, J. Actividad extractiva de moluscos en Venezuela. En: Fernández, J., Rey, M. Guevara, A. (Eds.) **Recursos marinos y acuicultura de las Rías Gallegas**. Pp 353-367. 2005.
- [24] MAC FADDIN, J. Pruebas bioquímicas individuales. En: Mac Faddin, J. (Ed.). **Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica**. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 301 pp. 1980.
- [25] MARTÍNEZ, J.; SACO, M.; HERNÁNDEZ, G.; LOZANO, A.; GARCÍA, O; ESPINOSA, J. Identification of *Salmonella serovars* isolated from live molluscan shellfish and their significance in the marine environment. **J. Food Protect.** 66:226-232. 2003.
- [26] MARTINS, M.T. Isolamento de *Salmonella* no ambiente aquático: significado sanitario. **Rev. Microbiol.** 19:29-39. 1988.
- [27] MERCK, E. **Manual de Medios de Cultivos**. Darmstadt. Alemania. Pp 364. 1994.
- [28] MIESCER, J.J.; HUNT, D.A.; REDMAN, J.; SALINGO, A.; LUCAS, J.P. Molluscan Shellfish, Oyster, Mussels and Clams. In: VANDERZANT, C.; SPLITTSTROESSER D.F. (Eds). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 3<sup>er</sup> Ed. American Public Health Association (APHA). Pp 897-918. 1992.
- [29] MINISTERIO DE AGRICULTURA Y CRÍA (MAC). Servicio Autónomo de los Recursos Pesqueros y Acuicola (SARPA). Normas para ejercer controles sanitarios y supervisión de la producción de moluscos bivalvos. Provisión N° 3 del 18-03-98. Condiciones sanitarias aplicables a los moluscos bivalvos vivos Provisión N° 4 del 18-03-98. En: Gaceta Oficial 36 429 del 06-04-98. Caracas, D. F. Venezuela. 927 pp. 1998.
- [30] PEREIRA, M.; MENEZES, M.; NUERNBERG, L.; SCHULZ, D.; VIEIRA, CL. Microbiological quality of oysters (*Crassostrea gigas*) produced and commercialized in the coastal region of Florianópolis-Brazil. **Braz. J. of Microbiol.** 37:159-163. 2006.
- [31] PRESIDENCIA DE LA REPÚBLICA DE VENEZUELA. Normas para la clasificación y el control de la calidad de los cuerpos de agua y vertidos o efluentes líquidos. Decreto 883 del 11-10-95. En: Gaceta Oficial Extraordinaria: 5021 del 18-12-1995. Caracas, D. F. Venezuela. 4 pp. 1995.
- [32] PRIETO, A.; MONTES, A.; RUIZ, L. Potencial de producción de biomasa en una población natural de la ostra *Crassostrea rhizophorae*, en la Laguna Grande de Obispo, Golfo de Cariaco, Venezuela. **INCI**. 33(10): 747-753. 2008.
- [33] ROSZAK, D.B.; COLWELL, R.R. Survival strategies of bacteria in the natural environment. **Microbiol. Rev.** 51:365-379. 1987.
- [34] SÁNCHEZ, P. **Las bacterias y su relación con el ambiente marino**. CPPS/PNUMA/CEPIS/ Min. Salud/IMARPE. Lima-Perú. 27 pp. 1988.
- [35] SARCOS, M.; BOTERO, L. Calidad microbiológica de la almeja *Polymesoda sólida* recolectada en playas del Municipio Miranda del estado Zulia. **Ciencia**. 13(1):34-43. 2005.
- [36] SILVA, A.; VIEIRA, R.; MENEZES, F.; FONTELES, A.; TORRES, R.; SANT'ANNA, E. Bacteria of fecal origin in mangrove oysters (*Crassostrea rhizophorae*) in the Cocó River estuary, Ceará State, Brazil. **Braz. J. Microbiol.** 35:126-130. 2004.
- [37] WAAGE, A. S.; VARDUN, T.; LUND, V.; KAPPERUD, G. Detection of low numbers of *salmonella* in environmental water, sewage and food samples by a nested polymerase chain reaction assay. **J. Appl. Microbiol.** 87(3):418-428. 1999.