

**BACTERIAS DEL GRUPO COLIFORME EN MEJILLONES
(*Mytilus edulis* L.) SIN DEPURAR**

*Por B. Moreno García,
M.^a E. Escacho Pérez y
V. Díez Fernández*

INTRODUCCION

La cría de mejillones (*Mytilus edulis* L.) en viveros o criaderos artificiales, a donde llegan los efectos de la contaminación de las aguas por vertidos o efluentes de origen humano y animal, determina el que estos moluscos contengan en el momento de su recolección microorganismos de procedencia entérica, algunos de ellos patógenos para el hombre. Por esta razón, desde el punto de vista sanitario, procede la prohibición de la venta directa de los moluscos obtenidos en las citadas condiciones y la obligación de su depuración por procedimientos adecuadamente controlados que aseguren el saneamiento del alimento.

El conocimiento de la contaminación por microorganismos de procedencia entérica de los moluscos cultivados en aguas litorales tiene una doble importancia, puesto que a la vez que es una medida de la adecuación sanitaria de las aguas para estos cultivos, es también un índice que puede utilizarse para evaluar el grado de peligrosidad de los moluscos para el consumidor y para establecer procedimientos eficaces de depuración.

Existen pocos trabajos españoles en este campo, e incluso algunos de los publicados han sido realizados con técnicas que hacen dudar de los resultados.

Con el fin de conocer la cuantía y el tipo de contaminación de los moluscos bivalvos cultivados en la Ría de Arosa (Pontevedra), se estudiaron una serie de muestras de mejillones sin depurar procedentes de esta Ría. Se eligieron como indicadores de contaminación los recuentos en placa a 35°C de la flora aerobia, los recuentos de coliformes y de estreptococos fecales, y la presencia o ausencia de estafilococos coagulasa positivos.

En el presente trabajo se da cuenta de los resultados obtenidos por lo que se refiere a los recuentos de coliformes, así como a la clasificación de las cepas aisladas pertenecientes a este grupo de gérmenes.

MATERIAL Y METODOS

Muestras. Las muestras estudiadas procedían de distintos puntos de la Ría de Arosa (Pontevedra) y fueron tomadas durante los meses de diciembre, enero, febrero y mayo (Tabla I). En el mapa de la Fig. 1 se sitúan geográficamente las áreas de muestreo. Las muestras se tomaron directamente de los viveros, se depositaron en saquitos de red de fibra de plástico y se trasladaron inmediatamente al laboratorio en una nevera portátil refrigerada. Cada muestra consistía en unos tres kg. de mejillones. Desde la toma de muestras en origen hasta la llegada de éstas al laboratorio no transcurrieron en ningún caso más de doce horas.

Una vez las muestras en el laboratorio, se conservaban en frigorífico a 4-5°C hasta el momento de ser manipuladas. El tiempo transcurrido entre la llegada de las muestras al laboratorio y su siembra nunca excedió de cuatro horas.

De cada saquito se tomaba una muestra de doce mejillones, cuidando de hacerlo de distintas partes del mismo. Los mejillones muestreados estaban perfectamente cerrados y no presentaban ninguna anomalía externa. La preparación de la muestra para su análisis microbiológico se hacía en la forma recomendada por la American Public Health Association (APHA, 1970). Se tomaron únicamente los cuerpos de los mejillones y no el líquido intervalvar. Reunidos los doce cuerpos en el vaso estéril de un homogeneizador, se añadía una cantidad igual en peso de agua de peptona estéril al 0.5 % y la homogeneización se realizaba a unas 6.000 rpm durante dos minutos. A partir de este homogeneizado, se hacían las diluciones decimales convenientes, utilizando el mismo diluyente. La dilución más concentrada utilizada en las siembras fue la 10^{-1} .

Determinación de coliformes por el NMP. La técnica seguida tanto para la determinación de coliformes totales como la de coliformes fecales por el NMP fue la recomendada por la American Public Health Association para el agua de mar y los moluscos (APHA, 1970). El medio para probables coliformes fue el caldo lauril sulfato triptosa (DIFCO) y el inóculo de 1 ml. Se sembraron 5 tubos por dilución. Las siembras se practicaban con la mayor rapidez posible, una vez realizadas las diluciones. Los tubos sembrados se incubaban a 35°C, haciendo las lecturas a las 24 y 48 horas, y anotando los tubos positivos (crecimiento con formación de gas). Los tubos positivos eran confirmados en caldo lactosa verde brillante con 2 % de bilis (DIFCO) por incubación a 35°C

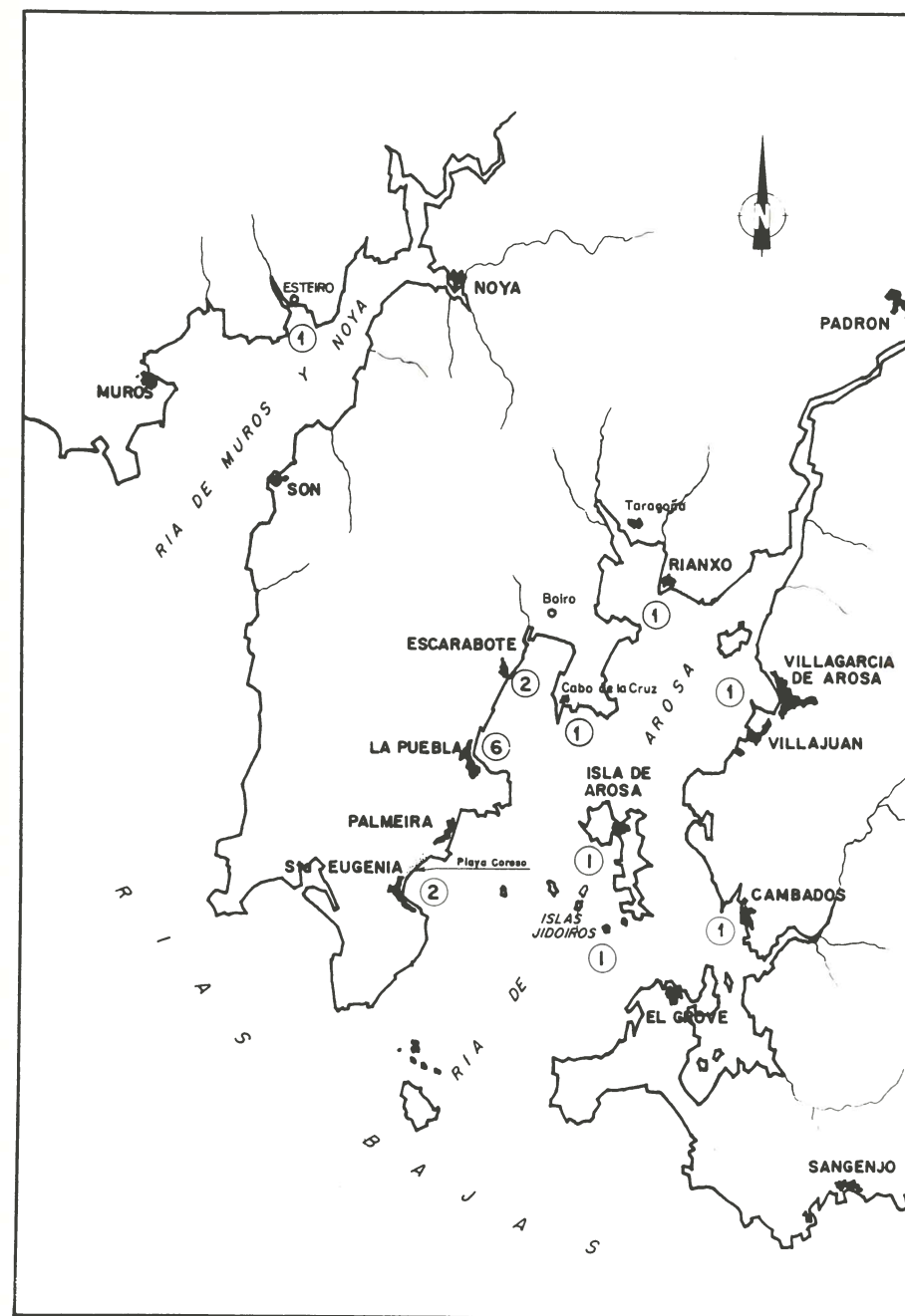


Fig. 1.—Procedencia de las muestras. En el interior de los círculos se indica el número de muestras procedentes de cada área de muestreo.

durante 48 horas. Los tubos que presentaban crecimiento con formación de gas se consideraron positivos de coliformes confirmados (= coliformes totales).

Para la determinación de coliformes fecales, se seleccionaron los tubos positivos de gas en caldo lauril sulfato triptosa y se sembraron en tubos de caldo E. C. (DIFCO). Los tubos sembrados se incubaron en un baño de agua circulante a $44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$. Las lecturas se hicieron a las 24 horas. Los tubos que mostraban turbidez con formación de gas se consideraron como positivos de coliformes fecales.

El NMP de coliformes totales y de coliformes fecales se calculaba a partir de los resultados positivos de las diluciones adecuadas con ayuda de una tabla de NMP.

Recuento en placa e identificación de coliformes. Los recuentos directos en placa de coliformes se llevaron a cabo como paso previo para la identificación de estos gérmenes, de la que se iba a obtener información de cómo estaba constituida la población de coliformes presentes en los mejillones. A continuación se señala la técnica seguida. De las diluciones correspondientes a cada muestra se sembraba por el método de profundidad en placas de agar desoxicolato lactosa (DIFCO), dos placas por dilución, cuidando de que la temperatura del agar fundido fuese lo más baja posible, aún manteniéndose el medio en estado suficientemente fluido. Una vez solidificado el medio, se añadían 5 ml. de medio no sembrado para cubrir la superficie. Las placas se incubaban a 35°C durante 24 horas. Pasado este tiempo, se hacía el recuento de las colonias lactosa positivas: rojas con opacidad del medio circundante. A partir de la media de los recuentos de ambas placas de una misma dilución, se calculaba el número de «probables» coliformes por gramo de carne de molusco. A continuación, se tomaban por muestreo al azar con ayuda de una tabla de números aleatorios (ICMSF, 1974) entre 5 y 10 colonias, según el número de colonias presentes. Cada una de las colonias muestreadas se sometía a la prueba de la fermentación de la lactosa en caldo lactosa verde brillante 2 % de bilis (DIFCO) para comprobar esta propiedad. También se realizaba una tinción por el método de Gram. La cifra de coliformes «confirmados» se obtenía corrigiendo la cifra de «probables» coliformes con ayuda del dato del porcentaje de las colonias estudiadas procedentes de cada muestra de mejillones que cumplían ambas condiciones: fermentación de la lactosa y morfología de bacilos Gramnegativos.

Las cepas confirmadas como coliformes del modo señalado se sembraban en agar eosina azul de metileno y se sometían después a las pruebas IMViC. Con los resultados de estas pruebas correspondientes a las cepas de coliformes procedentes de las 17 muestras de mejillones estudiadas se obtuvieron los porcentajes de los distintos tipos INViC presentes.

RESULTADOS Y DISCUSION

En la Tabla I se dan los recuentos obtenidos por la técnica del NMP de coliformes totales y de coliformes fecales, y en la Tabla II se agrupan estos resultados por frecuencias. Se observó una distribución bastante uniforme de

TABLA I
Recuentos de coliformes en mejillones sin depurar

N.º de la muestra	Mes de recogida	NMP/gr		Recuentos directos en placa (1) Coliformes/gr
		Totales	Fecales	
1	Diciembre	110	17	50
2	»	7	—*	10
3	»	2.400	49	1.080
4	Enero	221	46	161
5	»	170	11	112
6	»	130	—	77
7	»	95	—	180
8	»	4.600	95	10.700
9	»	110	—	104
10	»	95	4	280
11	Febrero	13	—	26
12	»	49	8	180
13	»	70	—	54
14	Mayo	2	—	15
15	»	4	—	11
16	»	33	4	64
17	»	5	—	47

(1) De agar desoxicolato lactosa. Corresponden a coliformes «confirmados», obtenidos corrigiendo la cifra de «probables» coliformes con ayuda del dato del porcentaje de colonias comprobadas como coliformes.

* Significa ausencia en 0.1 gr.

las cifras de coliformes totales, ya que de las 17 muestras estudiadas, en 11 (64,70 %) estaban comprendidas entre 11 y 1.000 gérmenes por gramo: en 6 (35,30 %) entre 11 y 100, y en 5 (29,40) entre 101 y 1.000. De las 6 muestras en las que se obtuvieron cifras extremas, 4 (23,53 %) contenían menos de 10 coliformes totales/gr., y 2 (11,77 %) más de 1.000. La mediana de las cifras

TABLA II
Distribución de frecuencias de coliformes totales y de coliformes fecales en mejillones sin depurar (NMP/gr)

Clases	Totales		Fecales	
	Frecuencias		Frecuencias	
Menos de 10	4 (23.53 %)		Ausencia en 0.1 gr	9 (52.94 %)
Entre 11 y 100	6 (35.30 %)		Entre 1 y 100	8 (47.06 %)
Entre 101 y 1.000	5 (29.40 %)		Más de 100	0
Más de 1.000	2 (11.77 %)			

obtenidas fue de 95. Se observó una disminución importante de los recuentos de coliformes totales correspondientes a las muestras de mayo en relación con los meses de invierno. Esta disminución puede interpretarse como debida a una menor contaminación de las aguas marinas de los criaderos en esta época del año, por menor cuantía de las lluvias y de los movimientos de las aguas marinas.

AYRES (1975) estudió 169 muestras de moluscos bivalvos procedentes de diversas costas del Reino Unido, la mayoría de ellas depuradas, encontrando que 67,2 % contenían menos de 10 coliformes/ml, el 17,3 % entre 10 y 100 y el 15,5 % restante más de 100. Los recuentos fueron realizados por este autor en agar de MacConkey n.º 3 (OXOID) por la técnica de «rolltube». THOMPSON y otros (1976) estudiaron la contaminación de ostras, agua y sedimento de la Bahía de Galveston, Texas, Estados Unidos. Los recuentos de coliformes (NMP/gr) en ostras oscilaron entre 0 y 2.400 (media de 81,3). De las 54 muestras estudiadas, 49 (90,7 %) fueron positivas de bacterias coliformes en 1 gr. Estos resultados son muy similares a los obtenidos por nosotros. ANDREWS y otros (1975), en un amplio trabajo en el que relacionan los índices de coliformes totales y coliformes fecales en ostras y en las aguas de los viveros con la presencia real de salmonelas en estos moluscos, dan recuentos de coliformes totales en 539 muestras de ostras procedentes de áreas «aprobadas», «aprobadas condicionalmente», «restringidas» y «prohibidas», en los Estados Unidos. Transformados sus resultados (que expresan en NMP/100 gr) en NMP/gr, y calculando los porcentajes correspondientes a cada frecuencia, se observa que el 32,65 % de las muestras contenían menos de 10 coliformes totales/gr, el 22,45 % entre 11 y 100, el 20,96 % entre 101 y 1.000, y el 23,93 % restante más de 1.000. Comparados con los nuestros, estos porcentajes indican una mayor frecuencia de los recuentos extremos, lo que puede explicarse por la más diversa procedencia de las muestras.

Por lo que se refiere a la posible presencia simultánea de microorganismos patógenos de procedencia entérica, e incluso como medida de la aptitud sanitaria de las aguas para la cría de moluscos, se concede un mayor significado en la actualidad a los coliformes fecales que a los coliformes totales. Los resultados por nosotros obtenidos sobre coliformes fecales ponen bien de manifiesto la contaminación de los mejillones estudiados por efluentes de origen fecal, ya que de las 17 muestras estudiadas, en 8 (47 %) se puso en evidencia la presencia de estos gérmenes en 0,1 gr. Cabe suponer con fundamento a la vista de los resultados de la Tabla I que si se hubiese ensayado la siembra de 1 gr de producto, la mayoría de las muestras hubieran sido positivas de coliformes fecales. En la Tabla II se da la distribución de frecuencias relativas a estos gérmenes: ausencia en 0,1 gr en 9 (53 %) muestras, 8 (47 %) muestras contenían entre 1 y 100, y ninguna de ellas dio una cifra superior a 100 coliformes fecales/gr.

Según NEUFELD (1971), en Canadá viene funcionando desde hace muchos años una norma aconsejada para ostras: menos de 230 coliformes fecales/100 gr. Iguales exigencias, pero con carácter legal, están en vigor en los Estados Unidos desde 1964 para ostras al nivel de la venta al público (U. S. Department of Health, Education and Welfare, 1965). En Inglaterra, la norma aceptada para moluscos bivalvos sin depurar es de 5 *E. coli*/ml de tejido (SHERWOOD y THOMSON, 1953) y para los depurados de 2 *E. coli*/ml (WOOD, 1963). La legislación española exige que todo molusco depurado no debe contener más de 500 *E. coli*/litro.

AYRES (1975), en el trabajo a que hacemos referencia antes, indica que el 95,1 % de las muestras contenían menos de 5 *E. coli*/ml, y el 92,8 % menos de 2/ml. Sólo el 2,95 % de las muestras contenían más de 15 *E. coli*/ml. A su vez, THOMPSON y otros (1976) dan cifras de coliformes fecales (NMP/gr) en ostras entre 0 y 430 (media 28,2). De las 54 muestras estudiadas, 40 (74,1 %) eran positivas en 1 gr. En el trabajo de ANDREWS y otros (1975), antes mencionado, aproximadamente la mitad de las muestras (49,72 %) contenían menos de 2,3 coliformes fecales/gr, el 33,57 % entre esta cifra y 100, y el 16,7 % restante más de 100. El mayor porcentaje de los recuentos extremos, comparados con nuestros resultados, es posible interpretarlo en el mismo sentido que para coliformes totales (véase antes).

Como ya hemos indicado anteriormente, paralelamente al recuento de coliformes por el NMP se llevó a cabo su recuento directo en medio sólido, como paso inicial para la identificación bioquímica de los tipos IMViC de coliformes presentes en los mejillones. Se pensaba obtener de este modo una información real de cómo estaba constituida esta población de coliformes en los mejillones sin depurar. En la Tabla I se dan los recuentos de coliformes «confirmados» en agar desoxicolato lactosa, obtenidos corrigiendo las cifras de «probables» coliformes con ayuda del dato del porcentaje de colonias procedentes de cada una de las muestras comprobadas como coliformes. La mediana de estos recuentos fue de 77, algo inferior a la mediana de coliformes totales por el NMP que fue de 94. De las 123 colonias muestreadas en agar desoxicolato lactosa, únicamente 70 estaban constituidas por bacilos Gramnegativos que fermentaban la lactosa, lo que confirma la escasa especificidad de este medio para el recuento directo de coliformes. Por esta razón, en lugar del agar desoxicolato lactosa cada vez se usa más para el recuento de coliformes en alimentos el agar lactosa bilis cristal violeta rojo neutro (FIL, 1958-74; APHA, 1972; HARRIGAN y MCCANCE, 1976). En la Tabla III se recoge la clasificación en tipos IMViC de las 70 cepas de coliformes estudiadas. El 10 % correspondía a *E. coli* tipo I (el verdadero coli de origen fecal). Otro 10 % a *E. coli* tipo II. Los tipos intermedios representaron el 20 %. Al género *Enterobacter* se adscribieron el 20 % de las cepas. El resto (40 %) pertenecían a otros diversos tipos IMViC.

TABLA III
Clasificación IMViC de las cepas de coliformes aisladas a partir de las siembras en agar desoxicolato lactosa (1)

	Gas en caldo E. C. a 44.5°C	Tipo IMViC	N.º de cepas	Porcentaje	
<i>Escherichia coli</i>					
Tipo I	+	+ + - -	7	10,00	
Tipo II	-	- + - -	7	10,00	20,00
Intermedios					
Tipo I	-	- + - +	10	14,29	
Tipo II	-	+ + - +	4	5,71	20,00
<i>Enterobacter aerogenes</i>					
Tipo I	-	- - + +	2	2,85	
Tipo II	-	+ - + +	1	1,43	
<i>Enterobacter cloacae</i> * Irregulares	-	- - + +	11	15,72	20,00
Diversos tipos			28	40,00	40,00
			70	100,00	100,00

(1) Según la clasificación de THATCHER y CLARK (1973).

* Diferenciable del *E. aerogenes* Tipo I por no fermentar el inositol.

RESUMEN

En este trabajo se estudia la contaminación por coliformes de los mejillones sin depurar procedentes de la Ría de Arosa (Pontevedra).

De las 17 muestras ensayadas, en 6 (35 %) la cifra de coliformes totales estaba comprendida entre 11 y 100, y en 5 (29 %) entre 101 y 1.000. De las 6 muestras en las que se obtuvieron cifras extremas, 4 (24 %) contenían menos de 10 coliformes totales/gr, y 2 (12 %) más de 1.000. La mediana de los valores obtenidos fue de 95. Las muestras correspondientes al mes de mayo presentaron una contaminación menor que las de los meses de invierno.

Por lo que se refiere a los coliformes fecales, 8 (47 %) de las muestras fueron positivas y en 9 (53 %) no se puso en evidencia la presencia de estos gérmenes en 0,1 gr de producto.

El estudio de 70 cepas de coliformes aisladas en medio sólido, puso de manifiesto que el 10 % correspondía a *E. coli* tipo I. Otro 10 % a *E. coli* tipo II. Los tipos intermedios representaron el 20 %. Al género *Enterobacter* se adscribieron el 20 % de las cepas. El resto (40 %) pertenecían a otros diversos tipos IMViC.

Los resultados obtenidos ponen bien de manifiesto la contaminación de los mejillones procedentes de la Ría de Arosa por efluentes de origen fecal, el riesgo que su consumo puede llevar consigo y la necesidad de una depuración adecuada antes de su comercialización.

RÉSUMÉ

Dans ce travail on étudie la contamination par des coliformes des moules non-dépurées provenant de la «Ría de Arosa» (Pontevedra).

Dans 6 (35 %) des 17 échantillons essayés, le chiffre de coliformes confirmés était compris entre 11 et 100, et dans 5 (29 %) autres, il était entre 101 et 1.000. Des 6 échantillons dans lesquels on a obtenu des chiffres extrêmes, 4 (24 %) contenaient moins de 10 coliformes confirmés/gramme, et 2 (12 %) en contenaient plus de 1.000/gramme. La médiane des valeurs obtenues a été de 95. Les échantillons correspondants au mois de Mai ont présenté une contamination inférieure à celle des mois d'hiver.

Quant aux coliformes fécaux, 8 (47 %) des échantillons ont été positifs, et dans 9 (53 %) d'entre eux il n'a pas eu d'évidence de la présence de ces germes dans 0,1 grammes de produit.

L'étude de 70 souches de coliformes isolées dans un milieu solide a montré que le 10 % correspondaient à l'*Escherichia coli* type I. Un autre 10 % correspondaient à l'*Escherichia coli* type II. Les types intermédiaires ont représenté le 20 %. Un 20 % des souches appartenaient au genre *Enterobacter*, et les restantes, 40 %, à d'autres types IMViC différents.

Les résultats obtenus montrent la contamination des moules étudiées par des effluents d'origine fécale, le risque entraîné par leur consommation et la nécessité d'une dépuración appropriée avant leur commercialisation.

SUMMARY

This work deals with coliform contamination of raw non purified mussels harvested at the Ría de Arosa, Pontevedra, Spain.

17 samples were examined and found to have the following coliform counts distribution: 4 (24 %) less than 10 MPN/gr, 6 (35 %) 11-100/gr, 5 (29 %) 101-1,000, and 2 (12 %) more than 1,000/gr. The median of the counts was estimated in 95. Samples harvested in May have lower counts than those harvested in the winter months.

Faecal coliforms were not detected in 0,1 gr in 9 (53 %) of the samples, and found to be less than 100/gr in the remaining.

70 strains of coliforms isolated in a solid medium were classified as follows: 10 % *E. coli* type I, 10 % *E. coli* type II, 20 % intermediate types, 20 % *Enterobacter* spp., 40 % other IMViC types.

It is concluded that samples submitted to study were contaminated with effluents of faecal origin and their consumption without purification would have represented a risk for human health.

BIBLIOGRAFIA

- ANDREWS, W. H. y otros (1975).—Comparative validity of members of the total coliform and fecal coliform groups for indicating the presence of *Salmonella* in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *J. Milk and Food Technol.* **38** (8), 435-456.
- APHA (1970).—Recommended procedures for the examination of sea water and shellfish. 4th edition, The American Public Health Association, Washington.
- APHA (1972).—Standard methods for the examination of dairy products. 13th edition, págs. 88-89. The American Public Health Association, Washington.
- AYRES, P. A. (1975).—The quantitative bacteriology of some commercial bivalve shellfish entering british markets. *J. Hyg., Cam.* **74**, 431-440.
- FIL (1958-74).—Normes internationaux. N.º 39. Méthode de routine normalisée pour la dénombrement des bactéries coliformes dans la lait cru. Fédération Internationale de Laiterie, Bruxelles.
- HARRIGAN, W. F. y McCANCE, M. E. (1976).—Laboratory Methods in food and dairy microbiology. págs. 143-144. Academic Press.
- ICMSF (1974).—Microorganisms in foods. 2. Sampling for microbiological analysis; principles and specific applications. International Committee on Microbiological Specifications for Foods, University of Toronto Press.
- NEUFELD, N. (1971).—Influence of bacteriological standards on the quality of inspected fisheries products. En «Fish Inspection and quality control», ed. R. Kreuzer. FAO/Fishing News (Books) Ltd.
- SHERWOOD, H. P. y THOMSON, S. (1953).—Bacteriological examination of shellfish as a basis for sanitary control. Citado por Ayres (1975). Véase antes.
- THOMPSON, C. A., VANDERZANT, C. y RAY, S. M. (1976).—Relationship of *V. parahaemolyticus* in oysters, water and sediment, and bacteriological and environmental indices. *J. of Food Science*, **41**, 117-122.
- U. S. DEPARTMENT OF HEALTH, EDUCATION AND WELFARE (1965).—Sanitation of shellfish growing areas. En «Microorganisms in foods. 2. Apéndice 6, págs. 172-189. Véase antes.
- WOOD, P. C. (1963).—The sanitary control of molluscan shellfish. Some observations on existing methods and their possible improvement. Citado por Ayres (1975). Véase antes.
- THATCHER, F. S. y CLARK, D. S. (1973).—Análisis microbiológico de los Alimentos, pág. 95. Editorial Acribia, Zaragoza.