

CATEDRA DE BROMATOLOGIA Y MICROBIOLOGIA DE LOS  
ALIMENTOS

(Prof. B. MORENO GARCIA)

**ESTREPTOCOCOS FECALES EN MEJILLONES  
(*Mytilus edulis* L.) SIN DEPURAR**

*Por B. Moreno,  
M.<sup>a</sup> E. Escacho,  
V. Díez y  
M.<sup>a</sup> L. García*

INTRODUCCION

La cría de moluscos bivalvos en viveros o criaderos artificiales, donde llegan los efectos de la contaminación de las aguas marinas por vertidos o efluentes de origen humano y animal, determina el que estos alimentos puedan contener 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 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 estos alimentos y para establecer procedimientos eficaces de depuración.

Existen pocos trabajos españoles en este campo y, además, algunos de los publicados han sido realizados con las técnicas oficiales utilizadas para el control sanitario diario de los procesos de depuración, técnicas excesivamente simplificadas.

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 (*Mytilus edulis* L.) sin depurar procedentes de esta Ría. Se eligieron como indicadores de contaminación los recuentos estándar en placa a 35° C y las determinaciones de coliformes totales, de coliformes fecales y de estreptococos fecales.

En un trabajo anterior (MORENO *et al.*, 1976), se ha dado 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. En el presente, se completan los resultados con los recuentos de gérmenes totales y de estreptococos fecales, haciendo particular referencia a las especies encontradas de estos últimos.

## MATERIAL Y METODOS

**Muestras.** Las muestras estudiadas, en total 17, procedían de la Ría de Arosa (Pontevedra). Datos sobre la situación geográfica de las áreas de muestreo, la época del año, la recogida y el transporte de las muestras al laboratorio ya han sido señalados en otro trabajo anterior (MORENO *et al.*, 1976). La preparación de las muestras para su análisis microbiológico se llevó a cabo 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. La dilución más concentrada utilizada en las siembras fue la  $10^{-1}$ .

**Recuentos estándar en placa.** Estos recuentos se realizaron por la técnica recomendada por la American Public Health Association para el agua de mar y los moluscos (APHA, 1970).

**Determinación de estreptococos fecales por el NMP.** La determinación del número de estreptococos fecales se llevó a cabo siguiendo, en líneas generales, la técnica aconsejada por RAJ *et al.* (1961). Se sembraron 5 tubos por cada una de las diluciones. Como medio de presunción se utilizó el caldo azida dextrosa (DIFCO), modificado por la adición de 0,003 % de azul de bromotimol. La confirmación se llevó a cabo en caldo azida violeta de etilo (caldo EVA, DIFCO). A partir de los tubos positivos en este último medio, se calculó la cifra de estos gérmenes por gramo de producto. Los valores que se dan en la Tabla I corresponden a estreptococos fecales confirmados.

**Recuento en placa e identificación de estreptococos fecales.** Los recuentos directos en placa de estreptococos fecales se llevaron a cabo, lo mismo que los de coliformes, para tener una información de cómo estaba constituida la población de estreptococos fecales presentes en los mejillones. De las diluciones del alimento se sembraba por el método en profundidad en placas de agar glucosa cloruro de trifetil tetrazolio acetato de talio (BARNES, 1956), utilizando dos placas por dilución. Una vez solidificado el medio, las placas se incubaban a 37° C durante 24-48 horas. Pasado este tiempo, se hacía el recuento de todas las colonias: con el centro rojo y la periferia blanca, blancas, rojas y rosas. A partir de la media de los recuentos de ambas placas de una misma dilución, se

obtenía el número de estreptococos fecales / gr. 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 éstas presentes. Cada una de las colonias muestreadas se sometía a la prueba de crecimiento en caldo EVA. También se realizaba una tinción por el método de Gram. La cifra que se da en los resultados como «recuentos por confirmación en caldo EVA» se ha calculado teniendo en cuenta el porcentaje de colonias que crecían en el referido medio y que estaban constituidas por cocos Gram (+). Las colonias «confirmadas» como estreptococos fecales se sometían aún a las pruebas de crecimiento en agar triptosa a 45° C y de la catalasa. La identificación de especies se realizó sometiendo cada una de las cepas estudiadas a las pruebas de crecimiento en caldo triptosa a pH 9,6, producción de ácido a partir de la lactosa, sorbitol, manitol, arabinosa, melibiosa y melezitosa, crecimiento en agar triptosa con 0,05 % de telurito potásico y crecimiento en el mismo medio con 6,5 % de ClNa.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Los recuentos estándar en placa oscilaron entre  $0,13 \times 10^4$  y  $16,5 \times 10^4$  (media  $5,8 \times 10^4$  gérmenes / gr). En la Tabla I se relacionan estos recuentos y

**TABLA I**  
**Recuentos estándar en placa y de estreptococos fecales**

N.º de la muestra	Recuentos estándar en placa ( $\times 10^4$ )	Estreptococos fecales		
		NMP / gr	Recuentos en medio sólido (1)	Recuentos confirmados (2)
1	1,5	2.210	1.610	1.570
2	0,13	330	320	295
3	16,5	1.300	1.300	1.040
4	8,5	1.090	1.650	850
5	7,1	790	650	260
6	10,5	490	300	200
7	5,5	240	120	93
8	12	490	625	555
9	3,7	240	100	100
10	11	94	350	300
11	0,35	109	115	46
12	0,9	240	310	207
13	1,5	109	290	87
14	5,55	49	110	33
15	0,54	33	95	42
16	8,65	130	190	95
17	4,55	130	260	104

(1) Agar glucosa cloruro de trifetil tetrazolio acetato de talio (BARNES, 1956).

(2) Corresponden a estreptococos fecales confirmados, obtenidos corrigiendo los recuentos en medio sólido con ayuda del dato del porcentaje de colonias comprobadas como estreptococos fecales.

en la Tabla II se distribuyen por frecuencias. La máxima frecuencia, representada por 9 (52,94 %) de las muestras, correspondió a los recuentos entre  $10^4$  y  $10^5$  gérmenes / gr. Recuentos más bajos (menos de  $10^4$ ) se obtuvieron en 4 (23,53 %) de las muestras, y más elevados (entre  $10^5$  y  $5 \times 10^5$ ) en las 4 (23,53 %) restantes. Ninguna de las muestras estudiadas alcanzó la cifra de  $5 \times 10^5$  gérmenes / gr, nivel que se considera como límite en los Estados Unidos para ostras en el momento de su venta al por mayor (THOMPSON *et al.*, 1976).

En la Tabla I se reúnen los resultados obtenidos en la determinación de estreptococos fecales por la técnica del NMP o de los tubos múltiples. La mediana de estos valores fue de 240. En la Tabla II se da la distribución de las muestras según su contenido en estos gérmenes. Es de destacar la uniformidad de los valores obtenidos, ya que en 11 (64,68 %) de las muestras estos valores estaban comprendidos entre 101 y 1.000 (NMP / gr), 3 (17,66 %) muestras contenían entre 11 y 100, y otras 3 (17,66 %) más de 1.000. Del mismo modo que en los coliformes totales, se observó una disminución de los recuentos en las muestras correspondientes al mes de mayo, respecto a los meses de invierno, disminución que resultó ser estadísticamente significativa.

En la Tabla II se relacionan también los recuentos de estreptococos fecales obtenidos en placas de agar glucosa tetrazolio acetato de talio y los recuentos «confirmados» por comprobación de una muestra de las colonias presentes en el medio citado. La mediana de estos últimos valores fue de 200. En la Tabla III se clasifican las 81 cepas de estreptococos fecales identificadas. Resulta un poco sorprendente el hecho de que, siendo el agar glucosa tetrazolio acetato de talio muy selectivo para estreptococos fecales, de las 118 colonias muestreadas únicamente 81 (69 %) fueran comprobadas como pertenecientes a este grupo de gérmenes. Es de destacar también que el color de las colonias en este medio no es, en nuestra experiencia, un carácter que permita la clasificación de las mismas. La diferente coloración se debe al distinto poder reductor del cloruro de trifenil tetrazolio que muestran las diferentes especies de estreptococos fecales. Las colonias rojas o con el centro

**TABLA II**  
**Distribución de frecuencias de los recuentos estándar en placa**  
**y de estreptococos fecales**

Clases		Frecuencias	
		Absolutas	%
Recuentos en placa (Gérmenes / gr)	Menos de $10^4$	4	23,53
	Entre $10^4$ y $10^5$	9	52,94
	Entre $10^5$ y $5 \times 10^5$	4	23,53
	Más de $5 \times 10^5$	0	
Estreptococos fecales (NMP / gr)	Menos de 10	0	
	Entre 11 y 100	3	17,66
	Entre 101 y 1.000	11	64,68
	Más de 1000	3	17,66

rojo y la periferia blanca correspondían, por lo general, a *Str. faecalis*. La mayoría de las colonias blancas se clasificaron como *Str. faecium* o *Str. equinus*. Con las colonias que mostraban distintas intensidades de color no pudo establecerse ninguna relación concreta entre el color de la colonia y la especie.

Los porcentajes de la Tabla III deben interpretarse en el sentido de que no sólo las especies identificadas se encontraban realmente en los moluscos estudiados, sino que, además, dado el plan de muestreo de las colonias

**TABLA III**  
**Clasificación de las cepas de estreptococos fecales aisladas en agar glucosa cloruro de**  
**trifenil tetrazolio acetato de talio**

Especies	Número de cepas	Porcentaje
<i>Streptococcus faecalis</i>	13	16,04
<i>Streptococcus faecium</i>	29	35,80
<i>Streptococcus durans</i>	11	13,58
<i>Streptococcus bovis</i>	10	12,35
<i>Streptococcus equinus</i>	3	3,71
Cepas no clasificadas	15	18,52
	81	100,00

identificadas, los porcentajes que se indican para cada una de las especies deben ser un reflejo de sus porcentajes reales en la carne de los mejillones estudiados. Un sólo factor modificante podría ser citado: la acción selectiva diferente del medio frente a las diversas especies por su distinta resistencia.

En conjunto, los resultados de este trabajo corroboran los ya publicados por nosotros sobre coliformes totales y coliformes fecales, y contribuyen a afirmar la conclusión de la existencia de una contaminación de origen fecal y, consiguientemente, de la necesidad de una depuración adecuada antes de la comercialización del producto.

## RESUMEN

En este trabajo, se completa el estudio de los índices de contaminación de origen fecal en 17 muestras de mejillones sin depurar procedentes de la Ría de Arosa, Pontevedra, con los recuentos de gérmenes totales y de estreptococos fecales, haciendo particular referencia a las especies encontradas de estos últimos.

Los recuentos estándar en placa oscilaron entre  $0,13 \times 10^4$  y  $16,5 \times 10^4$  (media  $5,8 \times 10^4$  gérmenes / gr).

Los valores de los índices de estreptococos fecales se distribuyeron del siguiente modo: en 11 (64 %) de las muestras entre 101 y 1.000 NMP / gr, en 3 (18 %) entre 11 y 100, y en las 3 (18 %) muestras restantes más de 1.000. La población de estreptococos fecales presente en los mejillones estudiados es-

taba integrada así: *Str. faecalis* 16 %, *Str. faecium* 36 %, *Str. durans* 14 %, *Str. bovis* 12 %, *Str. equinus* 4 %, cepas no identificadas 18 %.

Estos valores corroboran los resultados previos por nosotros obtenidos sobre coliformes y contribuyen a afirmar la conclusión de la existencia de una contaminación de origen fecal y la necesidad de una depuración adecuada antes de la comercialización del producto.

### SUMMARY

This work deals with the contamination indexes of raw non purified mussels harvested from floating parks at the Ría de Arosa, Spain.

17 samples were examined. Standard plate counts ranged from  $0,13 \times 10^4$  to  $16,5 \times 10^4$  (mean  $5,8 \times 10^4$  /-gr).

Results about total coliforms and faecal coliforms were reported previously. Samples distribution for faecal streptococci was: 64 % 101-1000 MPN /-gr, 18 % 11-100, 18 % more than 1000. The identification of strains isolated in a solid medium showed that 16 % were *Str. faecalis*, 36 % *Str. faecium*, 14 % *Str. durans*, 12 % *Str. bovis* and 4 % *Str. equinus*. The remaining 18 % were not identified.

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

### BIBLIOGRAFIA

- APHA (1970).-Recommended procedures for the examination of sea water and shellfish, 4th edition, The American Public Health Association, Washington.
- BARNES, E. M. (1956).-Methods for the isolation of fecal streptococci (Landcefield group D) from bacon factories. *J. Appl. Bact.*, **19**, 193.
- ICMSF (1974).-Microorganisms in foods. 2. Samplig for microbiological analysis: principles and specific applications. International Committe on Microbiological Specifications for Foods, University of Toronto Press.
- MORENO, B., ESCACHO, M.<sup>a</sup> E., y Díez, V. (1976).-Bacterias del grupo coliforme en mejillones (*Mytilus edulis* L.) sin depurar. *Anales de la Facultad de Veterinaria de León*, **22** (1), 315.
- RAJ, H., WIEBE, W. J. y LISTON, J. (1961).-Detection and enumeration of fecal indicator organisms in frozen sea foods. 2. Enterococci. *Appl. Microbiol.*, **9**, 195.
- 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.