

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 EDO. SUCRE. VENEZUELA

Isolation of *Vibrio spp.* And Evaluation of the Sanitary Condition of Bivalve Mollusks *Arca zebra* and *Perna perna* Collected on the Northeastern Coast of Sucre State, Venezuela

Crucita Graü, Amelia La Barbera, Aracelys Zerpa, Simón Silva y Oswaldo Gallardo

INIA / Sucre / Nueva Esparta. Av. Carúpano – Caigüire. Apdo. 236. Edo. Sucre. Venezuela. E-mail: Sucre@inia.gov.ve

RESUMEN

En el estado Sucre, los moluscos bivalvos son considerados como rubros estratégicos de gran importancia económica y social. Sin embargo, han sido señalados como vectores significativos de toxiinfecciones alimentarias. En consecuencia, el objetivo de este trabajo fue evaluar la incidencia de patógenos que los vinculan con brotes de afecciones entéricas y determinar su calidad e inocuidad. Se analizaron un total de 270 muestras de los moluscos bivalvos *Arca zebra* (pepitona) y *Perna perna* (mejillón) provenientes de tres estaciones de estudio: Isla Lobos, Punta Patilla y Punta La Iglesia, del estado Sucre, Venezuela. El muestreo se realizó con una frecuencia mensual, entre abril y diciembre de 2002. Se determinaron los índices de coliformes totales y fecales por el método de tubos múltiples (APHA). En la detección, aislamiento e identificación de bacterias patogénicas se centró el interés por especies del género *Vibrio*, utilizándose la metodología recomendada por la Food and Drug Administration (FDA). De las 270 muestras analizadas se aislaron un total de 247 cepas de vibrios, con predominancia *Vibrio parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* y *V. vulnificus*. Se reporta, *V. cholerae* no O1, sólo en las muestras de mejillones procedentes de Punta Patilla. En cuanto a los niveles de coliformes, los resultados indican que las muestras de *Perna perna* y *Arca zebra* no sobrepasaron los límites microbiológicos establecidos para los indicadores fecales, valorándose su calidad desde este punto de vista como satisfactoria para los niveles de contaminación fecal.

Palabras clave: Moluscos, bivalvos, patógenos, condición sanitaria.

ABSTRACT

Bivalve mollusks are considered as strategic food resources in Sucre state due to their high economic and social importance. However, it has been pointed out that they are significant vectors of food toxicity. In consequence, the purpose of this study was to evaluate the incidence of pathogenic bacteria that associate bivalve mollusks with enteric diseases and to determine their quality and innocuousness. A total of 270 samples of *Arca zebra* (Turkey wing) y *Perna perna* (brown mussel) were analyzed from three study sites: Isla Lobos, Punta Patilla and Punta La Iglesia, from Sucre state, Venezuela. Monthly samples were taken between April and December 2002. Total coliform and total fecal indices were determined by the multiple tubes method (APHA). Interest in the detection, isolation and identification of bacteria was centered on the Genus *Vibrio*, using the methods recommended by the Food and Drug Administration (FDA). A total of 247 strains of *Vibrio* were isolated, with predominance of *Vibrio parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* and *V. vulnificus*. *Vibrio cholerae* no O1, was only detected in brown mussel samples from Punta Patilla. Considering the levels of total coliforms, the results indicate that the samples of *Perna perna* and *Arca zebra* did not surpass the microbiological limits established for fecal indicators, and its quality was considered satisfactory from the point of view of fecal contamination.

Key words: Mollusks, bivalves, pathogens, sanitary condition.

INTRODUCCIÓN

Las costas nororientales de Venezuela son, por antonomasia, una de las regiones del Mar Caribe en la que la vida

de sus habitantes está estrechamente ligada al mar y a la explotación de distintos rubros pesqueros. La pesca artesanal de moluscos bivalvos como la pepitona (*Arca zebra*) y el mejillón (*Perna perna*), en estas regiones constituyen hoy en día un renglón económico importante y las posibilidades de cultivo parecen muy promisorias particularmente para las ostras (*Crassostrea virginica*, *Crassostrea rhizophorae*), los mejillones (*Perna perna*, *Perna viridis*) y pectínidos *Euvola (Pecten) ziczac* y *Lyropecten (Nodipecten) nodosus*. Estos bivalvos han sido organizadamente estudiados para establecer paquetes tecnológicos de cultivos [25], ante el declive en muchos países de las capturas de especies de bivalvos autóctonos y el incremento del comercio internacional de productos derivados de la pesca [28]. La importancia de los moluscos ha traspasado el valor escénico que tenía en tiempos pasados, ya que además de formar parte de trama trófica, muchas especies están siendo utilizadas como recurso alimenticio, indicadores de contaminación y de estrés funcional en ecosistemas costeros. En Venezuela algunas especies sostienen pesquerías de primer orden e importancia, cabe destacar que la pesquería de la pepitona ocupa el segundo lugar, después de la sardina, por pesca artesanal [25, 32]. Los principales moluscos bivalvos explotados comercialmente son: pepitona (*Arca zebra*) 86,1%, ostra perla (*Pinctada imbricata*) 8,3% y el mejillón (*Perna perna*) 2,1%, que aportan en su conjunto el 96,5% del total de la producción [37].

El estado Sucre cuenta con más de 20 bancos naturales productores de moluscos bivalvos y en cada uno existe el predominio de una especie en particular. En la actualidad toda la producción es producto de la pesca extractiva en bancos naturales ya que desde 1990 no se cultiva debido a que serios problemas limitan el desarrollo de cultivos, los cuales están representados por factores biológicos, económicos y sociales [25].

Paradójicamente entre los recursos marinos, los moluscos son unos de los organismos más impactados por la contaminación, por su condición de organismos filtradores que bioacumulan a través del bombeo del agua gran cantidad de bacterias patógenas, toxinas marinas y trazas de metales [22, 29]. Su flora bacteriana guarda relación con la calidad del medio donde se encuentran. En términos generales son vehículos en la transmisión de toxiinfecciones alimentarias. La incidencia de estos brotes sigue constituyendo uno de los problemas de salud pública más extendidos y permanecen como una de las causas principales de morbilidad, que ocupan el segundo lugar entre las enfermedades de notificación obligatoria. Se ha estimado que una de cada dos mil comidas de moluscos crudos origina enfermedades [35, 36]. Hoy día el riesgo de contraer una enfermedad de origen entérico es mayor si se toma en consideración la polución de las aguas costeras por desagües urbanos de alto contenido fecal [13]. En Latinoamérica y especialmente en países como Perú, Colombia y Venezuela se tiene constancia de la implicación de los productos de origen marino, especialmente los moluscos bivalvos, en brotes de toxiinfecciones alimentarias. En Venezuela, durante la epidemia del cólera se confirmó la incriminación de mariscos y pescados

en el brote presentado inicialmente en el estado Zulia [33]. Con expansión a otras regiones del país como el estado Sucre, región en la que la comercialización de moluscos como el mejillón y la pepitona representan una de las fuentes de ingreso importante de la pesca artesanal [14, 15].

Estudios realizados [21, 24, 38] confirman la existencia de diez géneros de patógenos bacterianos involucrados en toxiinfecciones alimentarias asociadas al consumo de mariscos, de los cuales el 4% de los brotes vinculan a patógenos asociados a la contaminación fecal y un 20% de las afecciones a una flora bacteriana endógena que incluye miembros de la familia *Vibrionaceae*, la cual comprende los géneros *Vibrio*, *Aeromonas* y *Plesiomonas*. Las bacterias del género *Vibrio* se caracterizan por ser miembros autóctonos de la biota bacteriana de los mares y estuarios, constituyendo desde el 0,1 al 60% del total de las bacterias heterotróficas [5]. Muchas especies de este género son patógenas al hombre, también están involucradas en afecciones de animales y se asocian al deterioro de las aguas. En el caso específico del hombre causan diarreas, infecciones en la piel y septicemias generalizadas graves. La patogenicidad relativa de cada especie difiere considerablemente, siendo moderada para el caso de *Vibrio parahaemolyticus*, mientras que para *V. cholerae* y *V. vulnificus* es extremadamente elevada [6, 41].

Dada la importancia de los moluscos bivalvos *Arca zebra* y *Perna perna*, como rubro estratégico de grandes perspectivas futuras de explotación y comercialización y los antecedentes que los involucran en brotes de afecciones entéricas asociadas a su consumo, el objetivo de este trabajo fue evaluar la incidencia de bacterias patógenas del género *Vibrio* y valorar su calidad e inocuidad sanitaria determinándose los niveles de organismos coliformes indicadores de contaminación fecal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la realización del presente estudio se recolectaron 270 muestras de moluscos bivalvos (*Arca zebra* y *Perna perna*) procedentes de bancos naturales de Chacopata y Guaca ubicados en la costa norte del estado Sucre (FIG. 1). El área de muestreo se conformó en tres estaciones: Isla Lobos (Chacopata), Punta Patilla y Punta La Iglesia (Guaca). Las muestras fueron clasificadas de la siguiente manera: 90 muestras de pepitona proveniente de Isla de Lobos, 90 muestras de mejillones de Punta Patilla y 90 muestras de mejillones de la estación La Iglesia. Los muestreos se realizaron con una frecuencia mensual, cada zona se muestreó durante nueve meses consecutivos desde abril hasta diciembre de 2002.

Toma y procesamiento de la muestra

La toma y preparación de las muestras se realizó bajo estrictas condiciones de asepsia utilizándose los procedimientos y técnicas recomendadas por Ortega y Quevedo [34]. Las muestras fueron colocadas en bolsas plásticas de cierres her-

méticos y transportadas en cavas de anime con hielo al laboratorio de Microbiología del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas del estado Sucre (INIA –Sucre). Se procesaron inmediatamente después de su arribo.

Análisis bacteriológicos:

Para la realización del recuento de bacterias aerobias mesófilas se utilizó la metodología recomendada por la ICMSF [19]. Se preparó un homogenizado tomando 25g de la carne del molusco y se le adicionó 225 mL de agua peptonada alcalina (APW, Merck, Darmstadt, German) para obtener una dilución de 10^{-1} . A partir de esta dilución se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-6} . Posteriormente se sembró por duplicado un mililitro de cada dilución en placas de Petri estériles, previamente identificadas y contentivas de Agar Plate Count (Merck). Las placas fueron incubadas a $35\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas. Los resultados se expresaron en unidades formadoras de colonias por gramos de muestra (UFC/g).

Como indicadores de contaminación fecal se determinaron los coliformes totales (CT) y fecales (CF) mediante la técnica estándar del Número Más Probable (NMP/100g de muestra) de fermentación en tubos múltiples siguiendo esquemas recomendados por APHA [1]. Se prepararon diluciones seriadas decimales en tubos con 9 mL de agua peptonada alcalina (APW, Merck) y a partir de ellos se inocularon 3 series de tres tubos con 9 mL de caldo Lauril Sulfato Triptosa (Merck). Se determinó el NMP/100mL de coliformes fecales o *E. coli* utilizando el valor del test (combinación de tubos confirmados positivos). Se compararon los resultados obtenidos con los estándares microbiológicos de calidad e inocuidad establecidos para los moluscos [30, 31].

Detección, aislamiento e identificación de vibrios enteropatógenicos: Se fundamentó en la metodología recomendada por la Food and Drug Administration [12] y en la descripción e identificación de miembros de la familia *Vibrionaceae* descrita por West y Colwel [40]. Se efectuaron aislamientos en medios de cultivos selectivos como agar TCBS (tiosulfato – citrato – sales biliares – sacarosa, Merck), mCPC (agar modificado con celobiosa, polimixina B y colistina, Merck) y no selectivos como AG (agar gelatina, Merck) y GS (agar gelatina sal, Merck). Se seleccionaron colonias típicas y previa indagatoria a las pruebas bioquímicas se preservaron en agar Tripticasa de Soya, TSA (BBL, Baltimore Biological Laboratories, USA) preparado con agua de mar (75%) y adición de 0,1mL de aceite mineral o parafina líquida estéril para evitar la desecación de los cultivos y se almacenaron a temperatura de $6\pm 0,1^{\circ}\text{C}$. La caracterización bioquímica de las distintas cepas aisladas se llevó a cabo mediante las pruebas de motilidad, oxidasa, descarboxilación de la lisina; arginina y ornitina, fermentación de carbohidratos, prueba ONPG (O – Nitrofenil –B-D- Galactopiranosido), prueba de Voges – Proskauer (Vp), tolerancia a la sal (se utilizó como alternativa agar gelatina con 0,3; 6; 8 y 10% de NaCl), hidrólisis de la urea, hidrólisis del agar gelatina, crecimiento a 42°C [4, 11]. Adicionalmente se complementaron

estas pruebas con el test de susceptibilidad al Vibriostato O/129 (Discos de 10 y 150 μg , Oxoid) [2,3] y prueba serológica utilizando el antisuero polivalente (grupo O1, Welcome Diagnóstico) para la confirmación de cepas de *V. cholerae* [2, 26, 38]. La patogenicidad de las cepas de *Vibrio parahaemolyticus*, asociada con la habilidad para producir una hemolisina directa termoestable (hemolisina Kanagawa, TDH) fue confirmada en el agar Wagatsuma preparado con eritrocitos frescos humanos [11].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el curso de la investigación se analizaron un total de 270 muestras de moluscos bivalvos lográndose aislar un total de 247 cepas de vibrios (TABLAS I y II), representando el 91,5% de los aislamientos, siendo predominantes *Vibrio alginolyticus* y *V. parahaemolyticus*, en todas las muestras testadas de las distintas zonas de estudio (FIG. 1).

Las características bioquímicas permitieron la caracterización y diferenciación de las distintas colonias pigmentadas aisladas del agar TCBS. Presentando una morfología bacilar curvada, Gram negativas, reacción positiva a las pruebas de la catalasa y motilidad, fermentación de la glucosa. La tolerancia a la sal (NaCl), permitió en forma definitiva la diferenciación entre las distintas especies aisladas, evidenciándose el carácter de halófila extrema de *Vibrio alginolyticus*, capaz de crecer a la concentración 10% de NaCl en el medio y el carácter moderadamente halófilo de las cepas de *V. cholerae* no O1 al crecer a concentraciones menores de 3% de NaCl [11]. *Vibrio alginolyticus*, conocido anteriormente como *Vibrio parahaemolyticus*, biotipo II, se considera como la especie más haloto-

TABLA I
 AISLAMIENTO DE VIBRIOS SPP EN LOS MOLUSCOS BIVALVOS *Arca zebra* Y *Perna perna* PROCEDENTES DE LOS BANCOS NATURALES DEL ESTADO SUCRE

| Meses | Nº de Aislamiento de <i>Vibrios spp</i> | | |
|------------|---|---------------------------------------|-------------------------------------|
| | P. Patilla (<i>Perna perna</i>) | P. Iglesias (<i>Perna perna</i>) | Isla Lobos (<i>Arca zebra</i>) |
| Abril | 3 | 3 | 5 |
| Mayo | 5 | 7 | 8 |
| Junio | 7 | 6 | 10 |
| Julio | 8 | 10 | 14 |
| Agosto | 12 | 14 | 16 |
| Septiembre | 23 | 18 | 22 |
| Octubre | 8 | 10 | 14 |
| Noviembre | 5 | 3 | 8 |
| Diciembre | 4 | 3 | 1 |
| Total | 75 | 74 | 98 |

TABLA II
ESPECIES DE *Vibrio* AISLADAS EN LOS MOLUSCOS BIVALVOS *Arca zebra* Y *Perna perna* PROCEDENTES DE LAS DISTINTAS ZONAS DE ESTUDIOS ENTRE LOS MESES DE ABRIL Y DICIEMBRE DEL AÑO 2002

| Meses | Nº (%) Cepas de <i>Vibríos spp</i> | | | | | | | | | | | | | | |
|------------|--------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|
| | <i>V. alginolyticus</i> | | | <i>V. parahaemolyticus</i> | | | <i>Vibrio vulnificus</i> | | | <i>V. cholerae</i> no O1 | | <i>Vibrio spp</i> | | | |
| | P. Patilla (<i>Perna perna</i>) | P. Iglesia (<i>Perna perna</i>) | Isla Lobos (<i>Arca zebra</i>) | P. Patilla (<i>Perna perna</i>) | P. Iglesia (<i>Perna perna</i>) | Isla Lobos (<i>Arca zebra</i>) | P. Patilla (<i>Perna perna</i>) | P. Iglesia (<i>Perna perna</i>) | Isla Lobos (<i>Arca zebra</i>) | P. Patilla (<i>Perna perna</i>) | P. Iglesia (<i>Perna perna</i>) | Isla Lobos (<i>Arca zebra</i>) | P. Patilla (<i>Perna perna</i>) | P. Iglesia (<i>Perna perna</i>) | Isla Lobos (<i>Arca zebra</i>) |
| Abril | 2(67,0) | 2(66,7) | 4(80,0) | 1(33,3) | 1(20,0) | 1(33,3) | | | | | | | | | |
| Mayo | 4(80,0) | 5(71,4) | 5(62,5) | 1(20,0) | 2(25,0) | | | 2(28,6) | | | | | | | 1(12,5) |
| Junio | 5(71,4) | 4(66,7) | 8(80,0) | 2(33,3) | 2(20,0) | | | 2(33,3) | | | | | | | |
| Julio | 4(50,0) | 6(60,0) | 8(57,1) | 1(12,5) | 4(40,0) | 4(28,6) | | | | 3(37,59) | | | | | 2(14,3) |
| Agosto | 8(66,7) | 7(50,0) | 10(62,5) | 4(33,3) | 6(42,9) | 6(37,5) | | | 1(7,1) | | | | | | |
| Septiembre | 15(65,2) | 10(55,59) | 18(81,8) | 6(26,1) | 5(27,8) | 2(9,1) | | | | 2(8,7) | | | | 3(16,7) | 2(9,1) |
| Octubre | 5(62,5) | 4(40,0) | 9(64,3) | | 6(60,0) | 3(21,4) | | | | 3(37,59) | | | | | 2(14,3) |
| Noviembre | 4(80,0) | 3(100,0) | 6(75,0) | 1(20,0) | | 2(25,0) | | | | | | | | | |
| Diciembre | 2(50,0) | 2(66,7) | 1(100,0) | 2(50,0) | 1(33,3) | | | | | | | | | | |
| Total | 49(65,3) | 43(58,1) | 69(70,4) | 18(24,0) | 22(29,7) | 22(22,5) | | | 2(2,7) | 8(10,7) | | | | 3(4,1) | 7(7,1) |

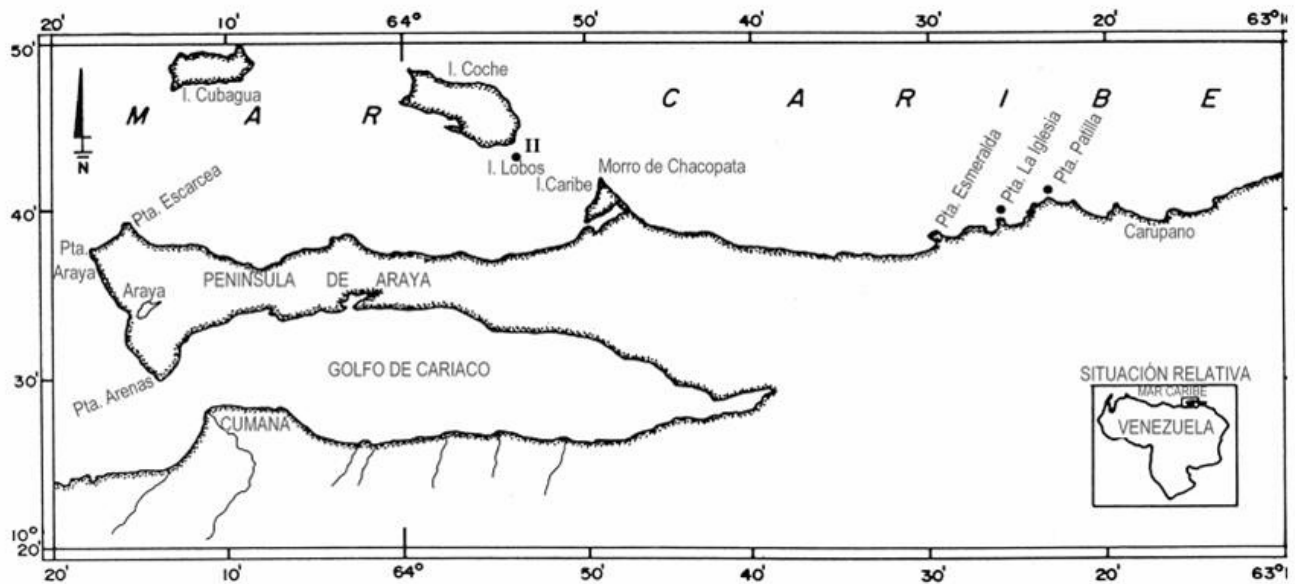


FIGURA 1. ÁREA DE ESTUDIO.

lerante y la más abundante en el agua de mar, muy común en el hábitat marino de países templados. Estas características le permiten persistir y por ende sobrevivir en distintos ambientes [27]. Ha sido reportado como agente causal de infecciones gastrointestinales en el hombre y ocasionalmente extraintestinales. Posee escasa virulencia y se asocia con frecuencia a otros patógenos. Su poder invasivo es bajo y las infecciones que origina suelen ser benignas y autolimitadas [17, 20].

La prueba de sensibilidad y/o resistencia al test vibriostato O/129, evidenció que *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* y *V. cholerae* muestran una elevada sensibilidad a 150 µg/mL de O/129 y una resistencia muy marcada a 10 µg/mL [9, 11].

La prevalencia de las distintas especies de vibrios aisladas de las muestras de moluscos bivalvos analizadas se presenta en la FIG. 2. En las muestras de mejillón procedentes de la estación de estudio Punta Patilla se aislaron tres especies de vibriones, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio cholerae* no O1. Representando *V. alginolyticus*, el 65,3% del total de los aislamientos, *V. parahaemolyticus* un 24,0% (TABLA II). El menor porcentaje de aislamiento le correspondió a *V. cholerae* no O1 (10,7%).

Del total de 74 cepas de vibrios aisladas en las muestras de mejillón proveniente de la zona de Punta La Iglesia, se reporta *V. alginolyticus* en el 58,1%, mientras que *V. vulnificus* se confirman en el 2,7% (TABLA II). *Vibrio spp* se aisló tanto en las muestras de *Arca zebra* procedentes de Isla Lobos (7,1%) como en las muestras de *Perna perna* de la estación de Punta La Iglesia (4,1%).

En las muestras de pepitonas (*Arca zebra*), se efectuaron 98 aislamientos de distintas cepas de vibrios, correspondiéndole el mayor porcentaje a *V. alginolyticus* (70,4%) y *V. parahaemolyticus* (22,5%). La elevada frecuencia de las cepas de vibrios aisladas y el predominio de *Vibrio alginolyticus*, de-

muestra una vez más la naturaleza autóctona de estos microorganismos en el ambiente marino y se corresponde con lo informado por otros autores [10,15, 24]. Por otra parte, la amplia distribución de *V. parahaemolyticus* en costas templadas y tropicales en todo el mundo ha sido confirmada en numerosas investigaciones. De Paola y col. [10] confirman que el patrón de abundancia de ciertas especies como *V. parahaemolyticus* y *V. alginolyticus* en sedimentos marinos está determinado por la influencia de los vertidos fecales y que estos son considerados como reservorios de patógenos potencialmente peligrosos, los cuales son transportados y en cierta medida sostienen la permanencia de los mismos.

De acuerdo al grado de virulencia y su relación con patologías humanas, de las 247 cepas de vibrios aisladas, *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus*, han sido referidas como altamente patógenas por su peculiaridad epidemiológica y su clásica patología. *V. vulnificus* se considera como la especie halófila más virulenta para el ser humano y ha sido asociado a cuadros sépticos con una tasa de mortalidad del 50%. Cabe destacar que ciertas enfermedades como la diabetes, hepatitis, cirrosis hepática y la hemocromatosis o enfermedad de la sobre carga del hierro y otras afecciones como el cáncer, las cuales son tratadas con medicamentos que debilitan o suprimen el sistema inmunológico potenciando los riesgos de padecer lesiones graves debido a la ingesta de moluscos o cuando quemaduras, cortes y llagas producidas en la piel entran en contacto con el agua de mar o moluscos que contiene *V. vulnificus* [18, 20].

Vibrio parahaemolyticus es reconocido como el agente causal más común de infección alimentaria. Su patogenicidad está relacionada con su capacidad de producir una hemolisina denominada hemolisina termoestable directa y alguna otra enzima involucrada en el establecimiento de la infección [40]. Al respecto, la capacidad de hemólisis, designada como el fenómeno Kanagawa (KP), considerado como el primer marcador

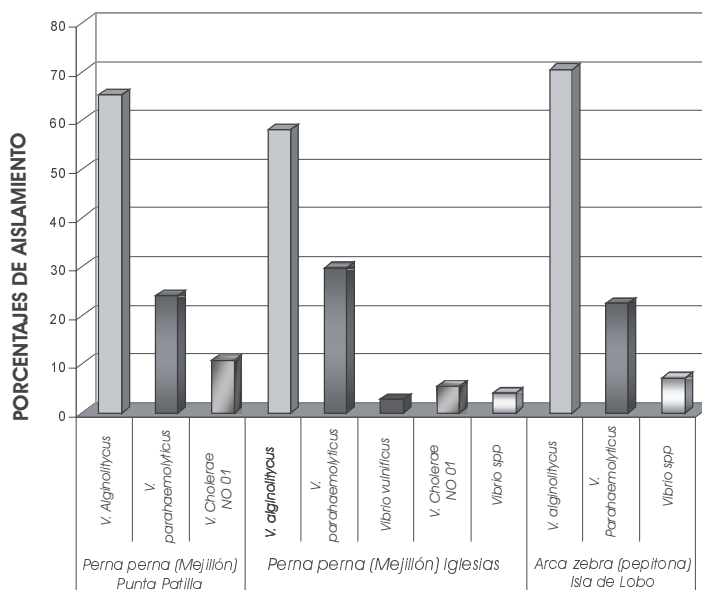


FIGURA 2. PREVALENCIA DE *Vibrio spp.* EN MOLUSCOS BIVALVOS PROCEDENTES DE LOS BANCOS NATURALES DEL ESTADO SUCRE.

de virulencia no fue observado en los aislados de *V. parahaemolyticus*. Sin embargo, algunos autores sostienen que cepas de *V. parahaemolyticus* KP negativos poseen una hemolisina relacionada (THR) similar a la hemolisina termoestable directa (TDH) en sus características fisicoquímicas, inmunológicas y biológicas y se caracterizan por poseer un gen asociado con un fenotipo ureasa positivo, marcador de virulencia. Estas cepas han sido relacionadas con brotes de diarreas. Ambas propiedades han sido reportadas en una minoría de cepas ambientales [4, 10].

Las bacterias del género *Vibrio* esta ampliamente extendidas e incluyen un número de especies potencialmente patógenas que pueden afectar no sólo al hombre sino también a todas las especies de peces, crustáceos, etc. Por lo tanto, ésto hace real la importancia de identificar y determinar su patogenicidad basada en la detección de genes codificantes para factores asociados con la virulencia con el objeto de realizar un diagnóstico preciso y evaluar el riesgo asociado a su presencia. Los estuarios son reservorios de estos genes que pueden ser incorporados y generar especies patógenas virulentas [4].

En la TABLA. III, se presentan los resultados de los recuento de aerobios mesófilos (UFC/100g) y de los índices de coliformes totales y fecales (NMP/100g), obtenidos en las muestras de moluscos recolectada en las diferentes zonas de muestreo.

Los resultados obtenidos indican un incremento en los valores de los coliformes totales (CT) y fecales (CF), en los meses de agosto, septiembre y octubre, reportándose para el mes de septiembre los valores más altos en todas las muestras analizadas. En el mes de septiembre, los índices de coliformes totales oscilaron entre 230 a 930 NMP/ 100g de muestra y los coliformes fecales entre 110 a 200 NMP/ 100g de

muestra. Estos resultados coinciden con los reportados por [15, 23, 24, 39], quienes indican un incremento de los niveles de coliformes en los moluscos con respecto a los hallados en las aguas de crecimiento o de producción. Este incremento está relacionado con la capacidad concentradora de los moluscos bivalvos al filtrar partículas en suspensión en el medio ambiente a través del bombeo del agua, aunado a una posible relación estacional entre los parámetros ambientales (temperatura y salinidad), al aumento del volumen de agua por efecto de las lluvias y vertidos, y 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 [13, 14].

En función a los niveles de coliformes fecales obtenidos en los moluscos y de acuerdo a la Gaceta Oficial de la República Bolivariana de Venezuela [30] en concordancia con lo establecido por el Ministerio de Agricultura y Cría –Servicio Autónomo de los Recursos Pesqueros y Acuícolas (Providencia Administrativa N°4) y la Normativa Oficial Mexicana [31] para Especificaciones Sanitarias de Moluscos Bivalvos Frescos, Congelados y Refrigerados, establece que los moluscos no deben sobrepasar un NMP de coliformes fecales o de *Escherichia coli* de 230/100g de carne y liquido intervalvar, y un recuento de aerobios mesófilos de 5×10^5 UFC/g, los resultados indican que las muestras de *Perna perna* (mejillón) y de *Arca zebra* (pepitona), no sobrepasaron los límites microbiológicos establecidos para los indicadores fecales, valorándose su calidad sanitaria como satisfactoria para los niveles de contaminación fecal.

Los coliformes han sido utilizados como indicadores sanitarios de la calidad del agua y también para clasificar las áreas de recolección de bivalvos [7, 8, 21], sin embargo, algu-

TABLA III

RECUESTO DE AEROBIOS MESÓFILOS Y DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES Y FECALES (NMP/100g) EN LOS MOLUSCOS *Perna perna* Y *Arca zebra* PROCEDENTES DE LAS DISTINTAS ZONAS DE ESTUDIOS

| Meses | Recuentos de Aerobios mesófilos (UFC/g) | | | Coliformes totales NMP/100g | | | Coliformes fecales MNP /100g | | |
|------------|---|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| | P.Iglesia (<i>Perna perna</i>) | P.Patilla (<i>Perna perna</i>) | Isla Lobos (<i>Arca zebra</i>) | P.Iglesia (<i>Perna perna</i>) | P.Patilla (<i>Perna perna</i>) | Isla Lobos (<i>Arca zebra</i>) | P.Iglesia (<i>Perna perna</i>) | P.Patilla (<i>Perna perna</i>) | Isla Lobos (<i>Arca zebra</i>) |
| Abril | 3,1x10 | 4,6x10 | 1,4x10 ² | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Mayo | 4,8x10 | 2,1x10 ² | 1,8x10 ² | 0 | 0 | 150 | 0 | 0 | 40 |
| Junio | 2,6x10 | 1,4x10 ⁴ | 3,6x10 ² | 40 | 0 | 110 | 0 | 0 | 30 |
| Julio | 1,7x10 ² | 2,6x10 ⁵ | 3,1x10 ³ | 0 | 0 | 230 | 0 | 0 | 90 |
| Agosto | 1,8x10 ² | 6,5x10 ² | 4,9x10 ⁴ | 230 | 90 | 430 | 40 | 0 | 90 |
| Septiembre | 1,5x10 ⁵ | 1,7x10 ⁴ | 5,9x10 ⁵ | 930 | 230 | 930 | 110 | 110 | 200 |
| Octubre | 2,3x10 ³ | 1,3x10 ² | 7,5x10 | 750 | 430 | 200 | 70 | 140 | 0 |
| Noviembre | 2,1x10 | 7,0x10 | 2,2x10 | 90 | 110 | 90 | 0 | 70 | 30 |
| Diciembre | 3,7x10 | 4,1x10 | 1,9x10 | 0 | 0 | 230 | 0 | 0 | 70 |

nos autores [16, 29] han demostrado que los coliformes no son indicadores inequívocos. Por otra parte, la no-correlación entre las especies patógenas del género *Vibrio* aisladas y los índices de coliformes fecales obtenidos en las distintas muestras evaluadas, demuestran la correspondencia de estos resultados con los reportados en otras investigaciones [24, 39]. Leyva [24] sostiene que los microorganismos indicadores utilizados para valorar la calidad sanitaria en los moluscos no resultan útiles en relación con las especies patógenas del género *Vibrio*, por la naturaleza autóctona de estas especies.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente estudio han demostrado la presencia de especies de *Vibrio* considerados como patógenos en todas las muestras de moluscos, los cuales pudieran significativamente contribuir en la aparición de brotes de gastroenteritis y otras afecciones entéricas asociados a su consumo en forma cruda o parcialmente cocidos.

Vibrio parahaemolyticus y *V. alginolyticus* representan un peligro potencial para el recurso pesquero de la región ya que han sido ampliamente reseñados como agentes etiológicos de septicemias en peces y crustáceos.

La condición satisfactoria para los niveles de contaminación fecal en los moluscos bivalvos no se correlaciona con las especies patógenas de *Vibrio* aisladas en los moluscos, por lo tanto, no tienen ningún valor para determinar el riesgo de salud pública que representa el consumo de estos productos.

RECOMENDACIONES

Continuar con el programa de monitoreo de patógenos en moluscos bivalvos para prevenir restricciones, prohibiciones y penalizaciones en cuanto a la extracción, comercialización y consumo, de parte de las autoridades sanitarias debido a su vinculación constante en brotes de toxoinfecciones.

Aplicar el uso de técnicas moleculares para determinar la patogenicidad de las cepas ambientales de *Vibrio parahaemolyticus* sobre la base de factores específicos de virulencia vinculados a los genes *tdh* y *trh* que codifican la hemolisina directa termoestable (*tdh*) y la hemolisina relacionada con *tdh* (*trh*) respectivamente.

Es necesario la implementación de un programa de educación en las comunidades pesqueras dedicadas a la extracción y procesamiento artesanal de los moluscos bivalvos, fomentándose mediante campañas divulgativas un manejo responsable del ambiente y del recurso.

AGRADECIMIENTO

Al Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA-MCT) y al Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura (INAPESCA-MAT) por haber financiado esta investigación a través del Proyecto 02-612-17005-004.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Compendium of methods for the microbiological ex-**

- mination of foods.** C. 3rd Ed. C. Vanderzaut and D.F. Sphittstoesser Edit. Washington, D.C.USA. 1.134pp. 1992.
- [2] ALSINA, M.; BLANCH, A.R. A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species. **J. Appl. Bacteriol.** 76:79-85. 1994.
- [3] ALSINA, M.; BLANCH, A.R. 1994. Improvement and update of a set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species. **J. Appl. Bacteriol.** 77:719-721. 1994.
- [4] BARBIERI, E.; FALZANO, L.; FIORENTINI, C.; PIANNETTI, A.; BAFFONE, W.; ALESSIA, F.; MATARRESE, P.; CASIERE, A.; KATOULI, M.; KÜHN, I.; MÖLLBY, R.; BRUSCOLINI, F.; DONELLI, G. Occurrence, Diversity, and Pathogenicity of Halophilic *Vibrio* spp. and Non-O1 *Vibrio cholerae* from Estuarine Waters along the Italian Adriatic Coast. **Applied and Environ Microb** 65(6):2748-2753. 1999.
- [5] BITTON, G.; HARVEY, R. Transport of pathogens through soils and aquifers In: **Environ Microb.** Wiley-Lies. New York. 103- 124 pp. 1992.
- [6] BLAKE, P. A.; WEAVER, R.E.; HOLLIS, D.G. Disease of humans (other than cholera) caused by vibrios. **Ann. Rev. Microb.** 34:341-367. 1980
- [7] CHAI, T.J.; HAW, T.J.; CALLEY, R. Microbiological quality of shellfish growing water Chesapeake Bay. **J. Food Pollut.** 57: 229-234. 1994.
- [8] DANIES, C.; LANG, J.; DONALD, M.; ASHBAL, J.N. Survival of fecal microorganisms in marine and fresh water sediments. **Appl. Environ. Microb.** 61:1888-1896. 1995.
- [9] DE PAOLA, A; KAYNER, C; MCPHERARSON, R. Elevated temperature method for recovery of *Vibrio cholerae* form oysters (*Crassostrea gigas*). **Appl. and Environ Microb.** 53 (5): 1181 - 1182. 1991.
- [10] DE PAOLA, A.; KAYSNER, C.; BOWERS, J.; COOK, D. Environmental investigations of *Vibrio parahaemolyticus* in Oysters after Outbreaks in Washington, Texas, and New York (1997 y 1998). **Appl. and Environ Microb.** 66: 4649-4654. 2000.
- [11] ELLIOT, E.L.; KAYSNER, A.; JACKSON, Ch. L.; TAPLIN, M.L. *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, and other *Vibrio* spp. In: **Bacteriol Analyt Man.** 8th Edition, Revision A. Chapter 9. Food and Drug Administration (FDA). Assoc. of Analytical Chemist, Arlington, Virginia. USA. 9.01-9.27pp. 1995.
- [12] FANG, S.; AVANG, W.; CHEN, L. Contamination if sea food by *Vibrio parahaemolyticus* in Taiwan. **Clin. Microb. Immunol.** 20 (6): 46 - 53. 1987.
- [13] GRAÜ DE M., C.; ZERPA A. Evaluación de la Calidad Microbiológica de la Pepitona *Arca zebra* en la zona de Chacopata Península de Araya. **Bol. Inst.Oceanogr.** Univ. Oriente, 38 (1): 42-43. 1999.
- [14] GRAÜ DE M., C.; ZERPA A. Ocurrencia y Distribución de *Vibrio Cholerae* y *V. parahaemolyticus* en el Golfo de Cariaco. Edo. Sucre. **Bol. Inst. Oceanogr.** Univ. Oriente, 38 (1): 80-81. 1999.
- [15] GRAÜ DE M., C.; ZERPA, A.; BERTI, O. Patógenos Emergentes Transmitidos por Moluscos Bivalvos del estado Sucre. **Acta Científ Venez.** 51. Suplemento N°2: 147. 2000.
- [16] GOYAL, S.M.; GERBA, CH.P.; MELNICH, J.L. Human enterovirus in oysters and their overlying water. **Appl. Environ. Microb.** 37: 572-581. 1979.
- [17] HOGE, P.; WATSKY, D.; PEELER, R.N.; LUBONATI, J.P., ISRAEL, E.; MORRIS, J.G. Epidemiology and spectrum of vibrio infections in a chesapeake bay community. **J Infect Dis.** 160:985-993. 1989.
- [18] HOI, L.; LARSEN, J.; DALSGAARD, L.; DALSGAARD, A. Ocurrence of *Vibrio vulnificus* Biotypes in Danish Marine Environments. **Appl and Environ Microb.** 64:7-13. 1998.
- [19] INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOOD (ICMSF). Microorganisms in Food. The International Commission on Microbiological Specifications for Food of the International Association of Microbiological Societies University of Toronto Press, Toronto. 228pp. 1982.
- [20] JANDA, J.; POWERS, C.; BRYANT, R. G.; ABBOTT, S.L. Current perspectives on the epidemiology and pathogenesis of clinically significant *Vibrio* spp. **Clin Rev.** 1:245-267. 1988.
- [21] LARKIN, E.; HUNT, D. Bivalve mollusks: control of microbiological contaminants. **Bioscience.** 32:193-197. 1982.
- [22] LEE, R.; MORGAN, O. Environmental Factors Influencing the Microbiological Contamination of Commercially Harvested Shellfish. **Water Scien and Techn.** 47(3):65-70. 2003.
- [23] LEYVA, C.; VALLEJO, R, V.; VALDÉS, A.E.; RODRÍGUEZ, M.C.; PÉREZ, S.B.; AROCHA, O.C. Estudio microbiológico de ostión congelado. **Rev Cub Aliment Nutr.** 3:118-121. 1989.
- [24] LEYVA, C.V.; VALDÉS, A.E.; CISNERO, D.E.; PÉREZ, S.B. Aislamiento de vibrios patógenos y valoración de la calidad sanitaria de ostiones frescos cosechados en Cuba. **Rev Cub Aliment Nutr.** 10:189-98. 1996.
- [25] LODEIROS, S.C.; MARÍN. B.; PRIETO, A. **Catálogo de moluscos marinos de las costas nororientales de Venezuela: Clase Bivalva.** Edición APUDONS. Cumana, Venezuela. 109 pp. 1999.

- [26] MADDEN, J.M.; MCCARDELL, B.A.; BOUTIN, B.K. Isolation and Identification of *Vibrio cholerae*. In: **Bacteriological Analytical Manual**. 6th Edition. Chapter 13. Food and Drug Administration (FDA). Assoc. of Analytical Chemist, Arlington, Virginia.USA.13.01-13.12pp. 1984.
- [27] MATSIOTA-BERNARD, P.; NAUCIEL, C. *Vibrio alginolyticus* wound infection after exposure to seawater in an air crash. **Eur. J. Clin. Microb. Infect.** Dis. 12:474-475. 1993.
- [28] MÉNDEZ, J.; GONZÁLEZ, A.; TIZÓN, A.; MARTÍNEZ, A. Marcadores Moleculares de Moluscos Bivalvos. Memorias. **I Simposium in Memoriam Francisco López. El Futuro de la Industria Pesquera en un Mundo Globalizado**. Universidad Santiago de Compostela. Galicia. 28-30/Octubre. España.147-150pp. 2002.
- [29] [29]METCALF, T.; MULLIN, B.; ECKERSON, D.; MOULTON, E.; LARKIN, E. Bioaccumulation and Depuration of Enteroviruses by the Soft –Shelled Clam, *Mya arenaria*. **Appl and Environ Microb.** 38: 275-282. 1979.
- [30] MINISTERIO DE AGRICULTURA Y CRÍA (M.A.C) - SERVICIO AUTÓNOMO DE LOS RECURSOS PESQUEROS Y ACUÍCOLAS (SARPA). Normas para ejercer Controles sanitarios y Supervisión de la Producción de Moluscos Bivalvos. Providencia N° 3 del 18-03-98. Condiciones sanitarias aplicables a los moluscos vivos. Providencia N°4 del 18-03-98. En: **Gaceta oficial** 36.429 del 6-4. Caracas, D.F. Venezuela. 303-927pp. 1998.
- [31] [31]NORMA OFICIAL MEXICANA (NOM-031-SSA1). Bienes y Servicios.Productos de la Pesca. Molusco Frescos – Refrigerados y Congelados. Especificaciones Sanitarias. 29pp. 1993.
- [32] NOVOA, D.; MENDOZA, J.; MARCANO, L.; CÁRDENAS, J. **Atlas pesquero marítimo de Venezuela**. Ed. SARPA, Caracas, Venezuela. 197pp. 1998.
- [33] ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD (OPS). Informe final, En: Consulta Técnica FAO/OPS/OMS sobre inocuidad y comercialización de los alimentos frente a la epidemia del cólera en las Américas. Buenos Aires, 6-8 de abril. OPS/. Washington, DC. Documento HPV/FOS/005/92.48pp. 1997.
- [34] ORTEGA, V.; QUEVEDO, F. Garantía de calidad de los laboratorios de microbiología alimentaria. De Andrómeda. S.A., México. 152 pp. 1991.
- [35] PETRERA, M.; MONTOYA, M. Impacto económico de la epidemia del cólera. Organización Panamericana de la Salud (OPS). **Serie de Informes técnicos** N° 22. OPS. Washington, DC. 74 pp. 1993.
- [36] QUEVEDO, F.; ARÁMBULO, P.; ESCALANTE, J.A.; ESTUPIÑAN, J.; ALMEIDA,C.; CUELLAR, J. Riesgos de transmisión del cólera por productos pesqueros: perspectiva regional en Sudamérica. **Rev. Sci. Tech. Off. Int.** Epiz. 16 (2): 673-683. 1997.
- [37] SALAYA, J. La pesca y cultivo de moluscos bivalvos en Venezuela, situación y tendencias a nivel de Latinoamérica y el Caribe. **Memorias. Taller: Aprovechamiento y comercialización de Moluscos Bivalvos**. Instituto de Ciencias y Tecnología. Facultad de Ciencias. UCV. Margarita, Edo. Nueva Esparta.24-26/Noviembre.Venezuela.5 – 11pp. 1999.
- [38] SHIMADA, T.; SAKAZAKI, R.; OUE, M. A bioserogroup of marine vibrios possessing somatic antigen factors in common with *Vibrio cholerae* 01. **J. Appl. Bacteriol.** 62: 452 - 456. 1988.
- [39] TROMPIZ, L.; JUDITH, A. Identificación de diferentes especies de *Vibrio* en muestras de agua y ostras en el Gran Eneal Municipio Páez. **Memorias. Congreso Venezolano de Microbiología. Sociedad Venezolana de Microbiología**. Capitulo Zulia, Maracaibo. 5-8/Noviembre. Venezuela.106pp. 2000.
- [40] WEST, P.A.; COLWELL, R. Identification and classification of Vibrionaceae an overview. In: **Vibrios in the environment, R.R. Colwell (Ed)**. John Wiley & sons, New York. 285 – 363pp. 1984.
- [41] YAMAMOTO, K.; TAKEDA, Y.; MIWATANI, T.; CRAIG, J.P. Evidence that a non -01 *Vibrio cholerae* produce enterotoxin that is similar but not identical to cholera enterotoxin. **Infect. Immun.** 41: 896 - 901. 1983.