

INDICADORES BACTERIANOS EN LOS MEJILLONES *Perna perna* (LINNÉ, 1758) Y *P. viridis* (LINNÉ, 1758) Y EN LAS AGUAS DE EXTRACCIÓN DE BIVALVOS PROCEDENTES DE LA COSTA NORTE Y SUR DEL ESTADO SUCRE, VENEZUELA.

Bacterial Indicators in the Mussels, *Perna perna* (Linné, 1758) and *P. Viridis* (Linné, 1758) and in Bivalve Extraction Waters, from the Northern and Southern Coasts of Sucre State, Venezuela.

Daniel Muñoz¹, Crucita Graü de Marín², Luz Bettina Villalobos de B.³, Carlos Martínez¹ y Aracelis Zerpa²

¹Departamento de Biología, Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre. ²Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas - INIA/Sucre-Nueva Esparta. ³Postgrado en Biología Aplicada, Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre.
E-mail: d_josem77@hotmail.com.

RESUMEN

Se evaluó la calidad sanitaria de los mejillones *Perna perna* y *P. viridis*, así como de las aguas de extracción en tres zonas de producción del estado Sucre, Venezuela. Se realizaron doce muestreos entre agosto 2003 a agosto 2004. En las muestras de agua se determinó la carga (NMP/100 ml) de coliformes totales (CT) y coliformes fecales (CF), mientras que a los mejillones se les realizó recuento en placa de aerobios mesófilos (AM), carga de CF (NMP/g) y *Escherichia coli*, además de la detección de *Salmonella* spp. *In situ* se midió la temperatura superficial del agua, salinidad y oxígeno disuelto. El agua de las zonas de Bahía Iglesia y Punta Patilla cumplió con los criterios de CT y CF (legislación venezolana y FDA-EUA), no así la procedente de la Ensenada La Chica, en donde se obtuvo para los meses de noviembre y diciembre, valores máximos de los mismos grupos, que fueron comparativamente con los límites establecidos. Los recuentos de AM en mejillones cumplieron con los criterios microbiológicos para su comercialización establecidos por la FDA-EUA. Los mejillones procedentes de la Ensenada La Chica mostraron contaminación, ya que los CF y *E. coli* mostraron la cifra de los 230 NMP/g (límite permitido). Solo en una oportunidad (marzo 2004) en Bahía Iglesia, se encontraron altas cargas bacterianas en el mejillón ($1,1 \times 10^4$ NMP/g de CF y *E. coli*). Se detectó *Salmonella* en la Ensenada La Chica solamente en octubre. No se encontró correlación entre las variables físico-químicas y las poblaciones bacterianas evaluadas. Se reco-

mienda realizar monitoreos mensuales del agua y los mejillones para que estas zonas de producción de mejillones puedan ser clasificadas y certificadas correctamente.

Palabras clave: Calidad sanitaria, mejillones, coliformes fecales, *Salmonella* spp.

ABSTRACT

The sanitary quality of the mussels, *Perna perna* and *P. viridis*, was evaluated, as well as that of the water in three zones of extraction in Sucre State, Venezuela. Twelve samplings were made between August 2003 and August 2004. In water samples, the total coliforms (TC) and fecal coliforms (FC) load were determined (MPN/100 ml), while in mussel samples a plate count of aerobic mesophils (AM), load of FC (MPN/g) and *Escherichia coli* were made, besides detection of *Salmonella* spp. *In situ*, the surface water temperature, salinity and dissolved oxygen were measured. Waters from Bahía Iglesia and Punta Patilla met the criteria for TC and FC (according to the Venezuelan legislation and FDA-USA), but that from Ensenada La Chica during November and December did not, since the maximum values for these two groups were comparatively higher than the allowed limits. The bacterial counts of mussels from the former two areas met the microbiological criteria for commercialization, but those from Ensenada La Chica showed an elevated contamination, since FC and *E. coli* surpassed the value of 230 MPN/g (allowed limit). Only in one opportunity (March, 2004) at Bahía Iglesia there was high bacterial load in

mussels (1.1×10^4 MPN/g of FC and *E. coli*). *Salmonella* was only detected in Ensenada La Chica in October. No relationship was found between the physical and chemical variables and the evaluated bacterial loads. A periodical monitoring of water and mussels is recommended in order to have a correct classification and certification of the mussel extraction zones.

Key words: Sanitary quality, mussels, fecal coliforms, *Salmonella* spp.

INTRODUCCIÓN

Los mejillones, *Perna perna* y *P. viridis*, constituyen una fuente tradicional de alimentos en el estado Sucre, Venezuela. La mayoría de los hoteles y restaurantes, así como los vendedores ambulantes de las playas obtienen estas especies de diversas áreas de extracción, entre las que destacan los bancos naturales de Bahía Iglesia y Punta Patilla, y las balsas mejilloneras ubicadas en la Ensenada La Chica (Golfo de Cariaco). Por ello, el estudio de su calidad microbiana requiere atención especial a fin de reducir los riesgos de los consumidores.

Frecuentemente, las áreas costeras se encuentran contaminadas con microorganismos del tracto gastrointestinal del hombre, debido al crecimiento poblacional y a la insuficiencia de los procesos de tratamiento de las aguas residuales. Como consecuencia, se impacta el ambiente marino y la calidad microbiológica de los bivalvos [5, 12, 13, 29]. Los bivalvos son organismos filtradores, que obtienen su alimento a través de las corrientes de agua creadas por los cilios que recubren las branquias, durante este acto se concentran en su interior microorganismos que pueden ser potencialmente patógenos al hombre [8, 19, 21, 41].

Habitualmente, la decisión de establecer un área como apta para el crecimiento y cosecha de moluscos se hace tomando en cuenta, entre otros factores, la presencia de organismos coliformes y en que número están presentes. La providencia administrativa N° 8 del Ministerio de Agricultura y Cría (MAC), del 18 de Marzo de 1998 [33], considera apta para la producción de bivalvos del tipo mejillón (*Perna perna* y *P. viridis*) a la Ensenada La Chica y Guaca-Guatapanare (Bahía Iglesia y Punta Patilla). En la misma se especifica que los moluscos vivos procedentes del lugar deben cumplir con lo establecido en las providencias N° 3 y 4, sobre condiciones sanitarias aplicables a los bivalvos vivos, y las normas para ejercer controles sanitarios y supervisión de la producción de los moluscos. La providencia N° 4, especifica que los moluscos bivalvos destinados para consumo humano inmediato deberán contener menos de 230 NMP de coliformes fecales y *E. coli* / g, y además, ausencia de *Salmonella* spp. en 25 g de carne [32]. No establece criterios para los aerobios mesófilos, pero la Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos de Norte América (FDA, EUA) [14] si lo hace: siendo a nivel de mercadeo de hasta $5,0 \times 10^5$ UFC/g (unidades formadoras de colonias por gramo).

Por su parte, en la Gaceta Oficial N° 5.021 del 18 de diciembre de 1995 [37] se dan las normas para la clasificación y el control de la calidad de los cuerpos de agua y vertidos o efluentes líquidos. En ésta se indican los límites microbiológicos máximos aceptables para las aguas marinas o de medios costeros destinados a la cría y explotación de moluscos consumidos en crudo, que son un promedio mensual menor de 70 NMP de coliformes totales/100 ml, pero sólo se toma en cuenta el promedio de este grupo bacteriano. En cambio, la FDA-EUA, en su programa sanitario de moluscos, especifica que, para aprobar una zona, la mediana para coliformes totales no debe sobrepasar de 70 NMP /100 ml y para los fecales su mediana no debe exceder de 14 NMP /100 ml [15].

Dada la importancia de los bivalvos *Perna perna* y *P. viridis*, como rubro representativo de grandes perspectivas futuras de explotación y comercialización, y los antecedentes [13, 14, 17, 43] que los involucran en brotes de afecciones entéricas asociadas a su consumo, se realizó la presente investigación, para evaluar la calidad sanitaria de tres áreas de producción de mejillones del estado Sucre, y con esto verificar el cumplimiento de los requisitos microbiológicos exigidos por la Legislación Sanitaria Venezolana y la FDA-EUA para áreas de crecimiento y de cosecha de moluscos bivalvos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

En el curso de un año, con una frecuencia mensual (agosto 2003 a agosto 2004), fueron colectadas muestras de agua y mejillones en tres zonas de producción del estado Sucre (FIG. 1): Zona 1. Ensenada La Chica, ubicada en la costa sur del Golfo de Cariaco, figura como un centro de producción del mejillón marrón *Perna perna*, cuya cría se practica en plataformas flotantes (dos en total) de aproximadamente 6x4,5 m con 170 cuerdas trenzadas (cada balsa) de neumáticos usados, entre 6 y 7 m de largo cada una. Zona 2, Bahía Iglesia y Zona 3, Punta Patilla comprenden dos bancos naturales ubicados en la costa norte del estado Sucre, donde coexisten las especies de *P. perna* y *P. viridis*. Sin embargo, estudios realizados [39, 43] indican una dominancia progresiva de *P. viridis*, la cual ha conllevado a un desplazamiento de *P. perna*. Las muestras estaban conformadas por ejemplares de *P. viridis* provenientes de estas dos áreas.

Toma y procesamiento de las muestras

En la recolección de las muestras de agua se utilizaron botellas esterilizadas (500 ml), sumergiendo las mismas a 30-40 cm aproximadamente, debajo de la superficie del agua. Por cada área se colectaron tres muestras de agua, dos destinadas para los análisis microbiológicos y la otra para la determinación de oxígeno disuelto por el método de Winkler descrito por Strickland y Parsons [42]. *In situ* se midió la temperatura superficial del agua con un termómetro de mercurio convencio-

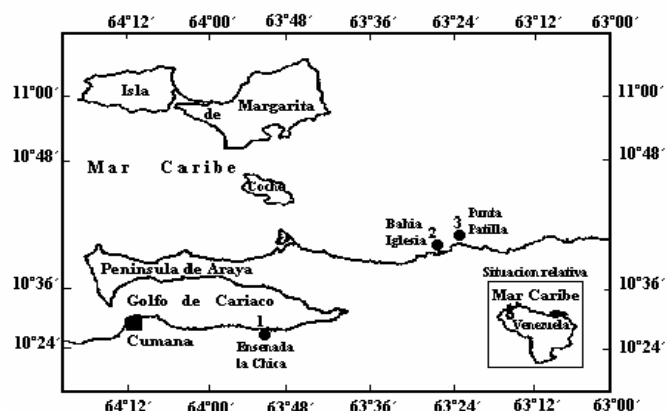


FIGURA 1. UBICACIÓN DEL AREA DE ESTUDIO Y LOCALIZACIÓN DE LOS SITIOS DE MUESTREO/ LOCATION OF THE STUDY AREA AND SAMPLING PLACES.

nal ($0,5^{\circ}\text{C} \pm 0,01$ de apreciación) y la salinidad mediante un refractómetro ATAGO/S-28E/China ($0,5 \text{ ‰}$ de apreciación). De igual modo, se colectaron por cada área, tres muestras de mejillones de unos 20 ejemplares cada una. La longitud total mínima de cada mejillón fue de 8 cm, tal como lo especifica la Gaceta Oficial N° 30.440, resolución 344 del 04 de julio 1974 [38]. Los mismos fueron colocados en bolsas plásticas con cierre hermético. Ambos tipos de muestras fueron transportadas en cavas de anime con hielo al laboratorio de microbiología del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícola (INIA) Sucre/Nueva Esparta donde se procesaron inmediatamente luego de su arribo.

La preparación de los moluscos para el análisis incluyó la limpieza de las valvas, remoción del contenido de la valva, mezclado y dilución de la muestra de acuerdo con lo recomendado por la Corporación Venezolana de Normas Industriales (COVENIN) [9] y Hunt y col. [22]. Se pesaron 50 g de la carne del molusco, de los cuales 25 g fueron homogeneizados en 225 ml de agua peptonada (Merck) al 0,1%, para obtener una dilución de 10^{-1} a partir de la cual se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-5} . Estas se utilizaron para determinar la densidad bacteriana de coliformes fecales, *E. coli*, y aerobios mesófilos. Los 25 g restantes se destinaron para la detección del género *Salmonella*. Con las muestras de agua se trabajó sin dilución.

Mejillones

Determinación del Número Más Probable de coliformes fecales y *E. coli* (NMP/g)

De acuerdo a lo señalado por la Asociación Americana de Salud Pública (APHA) [2] y COVENIN [11], se realizaron siembras de 1 mL en tres tubos por dilución, que contenían caldo Lauryl Sulfato Triptosa (CLTS, Merck) y confirmando en caldo *Escherichia coli* (EC, Merck). De los tubos que presentaban crecimiento y gas en este medio, se tomó una asada y se

inoculó en placas de Petri con agar "Eosin Methyl Blue" (EMB, Merck), incubando a 37°C por 24 h. Una vez transcurrido este tiempo, se seleccionaron colonias representativas de *E. coli* (de coloración moradas con brillo metálico) y morfológicamente distintas a éstas, las cuales se identificaron presuntivamente en base a la tinción de Gram, realizándose las siguientes pruebas [25, 27]: siembra en agar Tres Azúcares y Hierro (TSI), descarboxilación y desaminación de aminoácidos (lisina, ornitina y arginina), producción de ureasa, utilización del citrato, Rojo Metilo-Voges Proskauer, malonato, fermentación de carbohidratos (glucosa, manitol y arabinosa), producción de indol, hidrólisis de la gelatina, citocromo-oxidasa y motilidad.

Recuento de aerobios mesófilos

De acuerdo a la Norma COVENIN [10], se sembró por inclusión y por duplicado 1 mL de cada una de las diluciones, en placas de Petri, agregando agar para conteo en placa (Plate Count, Merck) para luego mezclar con movimientos circulares y dejándose solidificar. Las placas fueron incubadas a 35°C por 48h y luego se realizó el conteo en un rango de 30 a 300 colonias, expresando los resultados en UFC/g.

Detección, aislamiento e identificación de *Salmonella*

Se fundamentó en la metodología descrita en el Manual Merck [31]. Se preparó un homogeneizado con 25 g de mejillón y 225 mL de caldo Salmosyst (Merck), incubando por 7 h. De este cultivo se tomaron 10 mL y se colocaron en un tubo estéril, al cual se le agregó una pastilla del suplemento selectivo Salmosyst (Merck), incubando por 18 h a 37°C . Se efectuaron siembras en superficie de agares selectivos: Bismuto Sulfito (BS) y agar para salmonelas y shigelas (SS). La caracterización bioquímica se llevó a cabo mediante las pruebas diferenciales mencionadas anteriormente [27].

Agua

Para las pruebas presuntivas y confirmativas del grupo coliformes en agua de mar se siguieron las pautas señaladas por la APHA [1]. Para ello se sembraron por triplicado 10 ml de la muestra de agua en CLST a doble concentración y 1 y 0,1 mL en CLTS a simple concentración, confirmando en caldo Verde Bilis Brillante al 2% (Merck), incubando en doble serie: 37°C para coliformes totales y $44,5^{\circ}\text{C}$ para los coliformes fecales. De los tubos que presentaron crecimiento y gas a esta última temperatura, se tomó una asada, y se inoculó en el medio "Eosin Methyl Blue" (EMB, Merck), incubando a 37°C por 24 h. Una vez transcurrido este tiempo se seleccionaron colonias morfológicamente distintas y se identificaron mediante las pruebas anteriormente descritas [25, 27].

En cuanto a la evaluación estadística, los datos microbiológicos fueron transformados a logaritmo (base 10), para ser procesados estadísticamente mediante ANOVA, las diferencias significativas se comprobaron por una prueba a posteriori de Duncan. Por último, se aplicó un análisis de correlación

entre cada una de las variables estudiadas. Todos los análisis se realizaron al 95% de significación según Sokal y Rohlf [40].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realizaron doce muestreos en el periodo comprendido entre agosto 2003 a agosto 2004, en tres zonas de producción de mejillones (Ensenada la Chica, Bahía Iglesia y Punta Patilla), tomando de forma simultánea muestras del bivalvo y agua de mar. A continuación se muestran los resultados obtenidos:

Mejillones

Recuento de aerobios mesófilos:

Los valores promedio de este grupo bacteriano, obtenidos por recuento en placas, se muestran en la TABLA I. Los resultados de este análisis se compararon con el estándar fijado por la FDA [14] para moluscos a nivel de mercadeo, el cual es hasta 5×10^5 UFC/g. Los contenidos en mesófilos de las muestras analizadas siempre estuvieron por debajo del valor máximo permitido: $2,5 \times 10^4$ UFC/g (Ensenada La Chica), $8,6 \times 10^4$ UFC/g (Bahía Iglesia) y $7,6 \times 10^4$ UFC/g (Punta Patilla). Al respecto, el número de colonias contadas constituye una estimación de la cifra realmente presente, y refleja un manejo sanitario apropiado. De todas formas, no hallar un alto número de este grupo bacteriano que exceda el estándar, no significa que el molusco sea inócuo [23].

El análisis de varianza indicó que los resultados de aerobios mesófilos de las etapas de muestreo (meses) son diferen-

tes entre sí ($P < 0,01$), la prueba *a posteriori* de Duncan señaló tres grupos parcialmente superpuestos (TABLA II). No así los resultados obtenidos entre las estaciones, pues no se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$). Quizás estas diferencias entre los meses, se atribuyan a las variaciones que en un determinado momento pudieran ocurrir en áreas cercanas a la costa por efecto de las lluvias que arrastran material terrígeno, por lo que, los aerobios van a ser un reflejo de la variación de la materia orgánica que ingresa o se produce en los cuerpos de agua donde se desarrollan los moluscos.

Recuento de coliformes fecales y *E. coli*

Con la finalidad de tener un parámetro comparativo para la contaminación fecal la TABLA I representa la densidad del NMP de CF y *E. coli* (Ec) por gramo de mejillón, para los diferentes sectores en las campañas de muestreo. Se utilizó el requisito dado por el MAC en la providencia administrativa N° 4 [32] y por la FDA [15], según el cual los CF y Ec no deben exceder de 230 NMP/g. El 58% de las muestras procedentes de la Ensenada La Chica presentaron valores por encima del límite establecido, sobrepasando los criterios con respecto a los CF y en un 25% lo hacen con respecto a Ec; lo que permite inferir que el molusco se está cosechando en aguas con una probable contaminación fecal directa [23, 24, 30].

En el golfo de Cariaco se puede decir que, las condiciones hidrográficas dependen de la intensidad de la surgencia, la cual está estrechamente relacionada con el régimen de vientos alisios, con dirección predominante E-NE lo cual es un factor determinante del intercambio de las aguas entre el interior y el exterior del golfo, que afecta mayormente sus condiciones hidrográficas y

TABLA I

RECUESTO DE AEROBIOS MESOFILOS E INDICE DE COLIFORMES FECALES Y *E. coli* EN MEJILLONES PROCEDENTES DE TRES AREAS DE PRODUCCIÓN DEL ESTADO SUCRE/ RECOUNT OF AEROBIAL MESOPHIL BACTERIAE AND INDEX OF FECAL COLIFORMS AND *E. coli* IN MUSSELS FROM THREE PRODUCTION GROUNDS OF SUCRE STATE.

Meses	Recuento AM (UFC/g)			Colif. Fecal (NMP/g)			<i>E. coli</i> (NMP/g)		
	E.C	B.I	P.P	E.C	B.I	P.P	E.C	B.I	P.P
Agosto 2003	$8,3 \times 10^2$	$4,5 \times 10^2$	0	$1,1 \times 10^4$	$4,0 \times 10$	$4,0 \times 10$	$1,1 \times 10^4$	$4,0 \times 10$	$4,0 \times 10$
Septiembre	$5,7 \times 10^2$	$2,1 \times 10^4$	$7,6 \times 10^4$	$1,5 \times 10^2$	0	0	$1,5 \times 10^2$	0	0
Octubre	$3,0 \times 10^2$	0	0	$4,5 \times 10^2$	0	0	$4,5 \times 10^2$	0	0
Noviembre	$5,6 \times 10^2$	0	0	$4,5 \times 10^2$	$7,3 \times 10$	$4,0 \times 10$	$4,5 \times 10^2$	73	$4,0 \times 10$
Diciembre	$1,8 \times 10^2$	0	0	$4,5 \times 10^2$	0	0	$4,5 \times 10^2$	0	0
Enero	0	$7,7 \times 10^2$	$5,4 \times 10^2$	$4,5 \times 10^2$	0	0	$4,5 \times 10^2$	0	0
Febrero	0	0	0	$9,3 \times 10^2$	$4,0 \times 10$	$4,0 \times 10$	$9,3 \times 10^2$	0	0
Marzo	$2,5 \times 10^4$	$6,5 \times 10^2$	$3,1 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$	$1,1 \times 10^4$	$4,0 \times 10$	$2,3 \times 10^2$	$1,1 \times 10^4$	0
Abril	$1,4 \times 10^4$	$8,6 \times 10^4$	$2,2 \times 10^4$	$2,3 \times 10^2$	$4,0 \times 10$	$7,3 \times 10$	$2,3 \times 10^2$	0	$7,3 \times 10$
Mayo	$3,2 \times 10^3$	$9,4 \times 10^2$	$5,0 \times 10^2$	$3,9 \times 10^2$	$1,4 \times 10^2$	$1,4 \times 10^2$	$3,9 \times 10^2$	$7,3 \times 10$	$7,3 \times 10$
Julio	$8,8 \times 10^3$	$3,5 \times 10^3$	0	$4,0 \times 10$	$9,0 \times 10$	$9,0 \times 10$	$4,0 \times 10$	$9,0 \times 10$	$9,0 \times 10$
Agosto 2004	$5,5 \times 10^2$	0	0	$1,5 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$	$1,5 \times 10^2$	$1,5 \times 10^2$	$9,1 \times 10$	$7,3 \times 10$

UFC/g: Unidades Formadoras de Colonias/gramo; NMP/g: Número Más Probables/gramo; E.C: Ensenada La Chica; B.I: Bahía Iglesia; P.P: Punta Patilla; AM: aerobios mesófilos.

TABLA II
ANÁLISIS DE VARIANZA DE LOS RECUENTOS DE AEROBIOS MESÓFILOS (UFC/g) EN MEJILLONES PROVENIENTES DE TRES ÁREAS DE PRODUCCIÓN DEL ESTADO SUCRE/ ANALYSIS OF VARIANCE OF THE RECOUNTS OF AEROBIAL MESOPHIL (CFU/g) IN MUSSELS FROM THREE PRODUCTION GROUNDS OF SUCRE STATE.

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	g.l.	Media Cuadrada	Razón F	Nivel significancia
Entre grupos	64,5724	11	5,87022	3,04	**
Dentro de grupos	46,303	24	1,92929		
Total	110,875	35			

** Diferencia significativa (P<0,01)

Grupos homogéneos con nivel de confianza del 95%

Meses	N	Promedio	Grupos
Febrero 2004	3	0,0000	-----
Octubre 2003	3	0,8262	
Agosto 2004	3	0,9137	
Noviembre 2003	3	0,9163	
Diciembre 2003	3	1,0852	
Agosto 2003	3	1,8579	
Enero 2004	3	1,8734	
Julio 2004	3	2,4962	
Mayo 2004	3	3,0596	
Marzo 2004	3	3,2348	
Septiembre 2003	3	3,9866	
Abril 2004	3	4,4744	

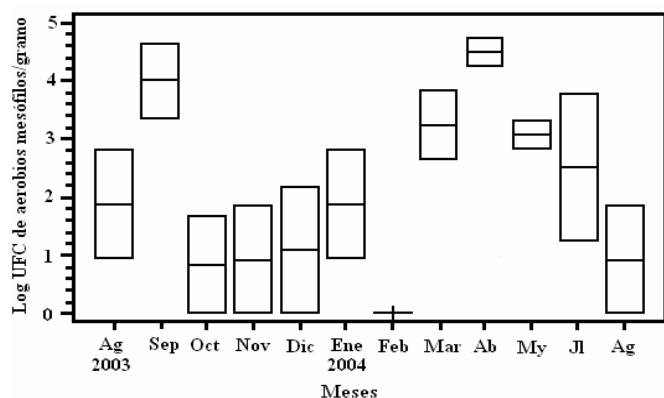


FIGURA 2. VALORES PROMEDIO DE BACTERIAS AEROBIAS MESÓFILOS DURANTE LOS MESES DE MUESTREO/ AVERAGE VALUES OF AEROBIAL MESOPHIL BACTERIAE DURING THE SAMPLING MONTHS.

químicas. Las fluctuaciones mensuales de los parámetros hidroquímicos indican que existen tres períodos de distinta magnitud de la surgencia durante el año; es decir, primero un período comprendido entre enero y abril (o mayo) con intensidad fuerte acompañada de temperaturas relativamente bajas (menor a 23°C), bajo oxígeno (inferior a 3 mL/L) y alta concentra-

ción de nutrientes (fosfato y nitrato) lo que provoca una elevada producción orgánica; el segundo en los meses de junio y agosto, con intensidad moderada predominando el agua subtropical; y el tercero en los meses entre septiembre y noviembre, correspondiente a la época de menor intensidad de los vientos, con temperaturas relativamente altas (mayor a 24°C), alto oxígeno (superior a 3 mL/L) y bajo contenido de nutrientes. La transparencia es generalmente elevada. Las variaciones verticales y estacionales de la salinidad en el golfo de Cariaco (oscilaciones entre 36,70 y 37,20 ‰) son relativamente pocas en comparación con las de la temperatura [4, 35].

Las zonas de Bahía Iglesia y Punta Patilla presentaron los niveles más bajos con respecto a los grupos bacterianos evaluados, cumpliendo con los criterios microbiológicos establecidos por la providencia administrativa Nº 4 del MAC y la FDA; valorándose su calidad sanitaria como satisfactoria para los niveles de contaminación fecal [21]. Sin embargo, en marzo (2004), se observó un valor superior ($1,1 \times 10^4$ NMP/g, común a los grupos bacterianos analizados) a los 230 NMP/g en la zona de Bahía Iglesia. Es probable que la causa de este valor de $1,1 \times 10^4$ NMP/g, en ese mes, se deba a que se hayan creado ciertas turbulencias que hicieran resuspender material depositado en el fondo e hicieran circular por la zona el agua contaminada, lo que indicaría que realmente el agua de esta zona está siendo impactada de manera intermitente con aguas servidas de origen cloacal y la misma está siendo filtrada por

los mejillones durante el proceso de alimentación normal del mismo [23].

De acuerdo al análisis de varianza se detectó que hay diferencias significativas en la enumeración de CF ($P < 0,05$) y EC ($P < 0,01$) entre estaciones, evidenciándose la formación de dos grupos homogéneos (FIG. 3). Se observó que en la Ensenada La Chica, los impactos contaminantes, desde el punto de vista fecal, son más significativos y constantes, explicado este último por el hecho de que no se encontraron diferencias significativas entre los meses ($P > 0,05$), dándole más importancia a las posibles descargas que se originan en la zona. La presencia de estos grupos indicadores de contaminación fecal en valores considerablemente altos, indica que la zona está siendo afectada por las aguas cloacales provenientes de las poblaciones cercanas al área de estudio. Cabe destacar que la descarga diaria de millones de litros de aguas residuales en los sistemas acuáticos semicerrados puede ser determinante en la calidad de sus aguas, especialmente en la época del año cuando disminuye la fuerza de los vientos y se producen condiciones de remanso, creándose zonas anóxicas en las partes más profundas [18]. Por su parte, Bahía Iglesia y Punta Patilla, al obtener los valores más bajos de densidad bacteriana, pudiera significar que las corrientes marinas hacen que las posibles descargas puntualizadas no afecten estas zonas en la mayor parte del tiempo.

Por otra parte, es importante considerar la contribución del suelo y sedimento, adyacentes al área de crecimiento de los mejillones, como reservorios de bacterias coliformes durante los períodos de precipitación, como consecuencia de la escorrentía en la superficie de la tierra, arrastrando desechos domésticos y agrícolas a las costas [44].

Detección de *Salmonella* spp.

En el presente estudio se logró detectar la presencia de *Salmonella* spp. en la Ensenada La Chica, sólo para el mes de octubre 2003, mientras que, en Bahía Iglesia y Punta Patilla, ausencia de la misma. A pesar de que el NMP/g de los organismos indicadores, en la primera zona, se mantuvo por encima de los límites permitidos, la detección del patógeno fue muy baja o nula. Este resultado indica la no-correlación entre el número de coliformes fecales y el aislamiento de este patógeno, coincidiendo con otras investigaciones [6, 29, 36]. Es posible que la presencia de este patógeno en la Ensenada La Chica, sea debido a la presencia de aves marinas que se posan en las balsas de cultivo, claro está, que su presencia en ellas no es constante. En este sentido, Fica y col. [16] señalan que las aves pueden ser responsables de una pequeña parte como reservorios de *Salmonella*.

La ausencia de *Salmonella* spp. en la mayoría de las muestras, no se puede interpretar como que esta bacteria posee una baja capacidad de supervivencia en este tipo de hábitat. Por el contrario, estudios realizados [3, 29, 46] han comprobado que diversas cepas virulentas de *Salmonella* spp. tie-

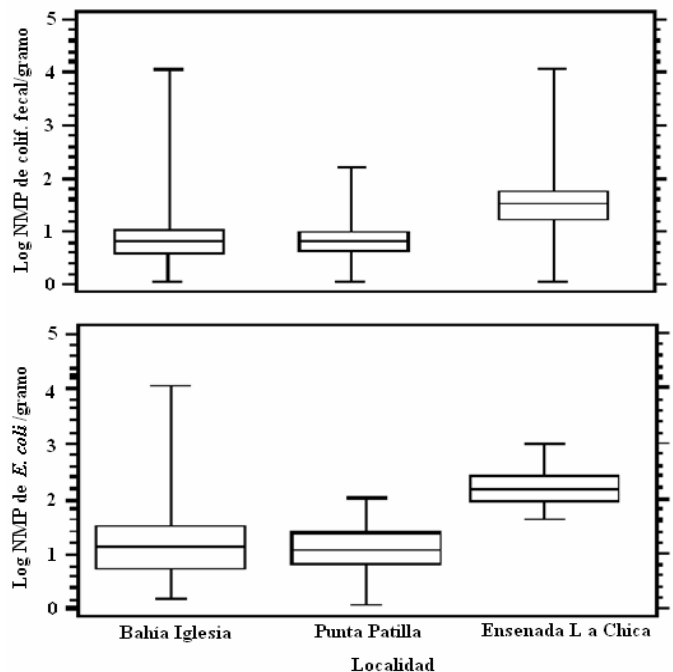


FIGURA 3. VALORES PROMEDIO DE COLIFORMES FECALES Y DE *E. coli* PARA LAS ESTACIONES DE MUESTREO/AVERAGE VALUES OF FECAL COLIFORMS AND *E. coli* FOR THE SAMPLING STATIONS.

nen la capacidad de sobrevivir por períodos largos en sistemas acuáticos y adaptarse a éstos. En términos generales, según los datos obtenidos en esta investigación, se podría sugerir que *Salmonella* spp. debe estar presente en niveles muy bajos o se encuentra en estado viable no cultivable (VBNC). El estado VBNC es una respuesta de sobrevivencia de las bacterias asporógenas a cambios de factores externos como temperatura, salinidad, nutrientes, potencial redox, pH y la incidencia de competidores [17].

Agua

Recuento de coliformes totales y fecales

Los resultados obtenidos en muestras de agua (TABLA III), fueron comparados con las exigencias de la Legislación Sanitaria Venezolana y la FDA, según las cuales los CT y CF no deben sobrepasar los 70 y 14 NMP/100 mL, respectivamente [15, 37]. Las muestras de agua de las localidades muestreadas cumplieron en la mayoría de los casos, con los requisitos antes mencionados. Sin embargo, en el caso de las muestras provenientes de la Ensenada La Chica se registraron valores que sobrepasaron los límites en los meses de noviembre y diciembre del 2003, representando el 16,7% de las muestras. Es probable que la alta densidad de coliformes encontrados en esta zona y para estos meses, en particular los fecales, indicaría que la zona estaba siendo contaminada para el momento de la toma de las muestras, ya que como señala

TABLA III
ÍNDICE DE COLIFORMES TOTALES Y COLIFORMES FECALES (NMP/100 ml) EN AGUA PROCEDENTES DE TRES ÁREAS DE PRODUCCIÓN DE MEJILLONES DEL ESTADO SUCRE/ INDEX OF TOTAL COPLIPHORMS AND FECAL COLIPHORMS (MPN/100 mL) IN WATER FROM THREE MUSSEL PRODUCTION GROUNDS OF SUCRE STATE.

Meses	CT			CF		
	B. I.	P. P.	E. C.	B. I.	P. P.	E. C.
Agosto 2003	0	0	4	0	0	4
Septiembre	4	4	0	0	4	0
Octubre	0	4	7	0	0	7
Noviembre	0	0	150	0	0	20
Diciembre	0	3	93	0	0	93
Enero	0	0	0	0	0	0
Febrero	0	0	0	0	0	0
Marzo	7	0	0	7	0	0
Abril	3	0	3	0	0	3
Mayo	0	0	23	0	0	3
Julio	3	4	9	0	3	3
Agosto 2004	4	3	4	4	3	3

NMP/100 ml: Número Más Probables/100 ml; CT: Coliformes Totales; CF: Coliformes Fecales; B.I.: Bahía Iglesia; P.P.: Punta Patilla; E.C.: Ensenada la Chica.

Iriarte y Rengel [24], la supervivencia de los fecales en el agua es más corta que la de los totales. En general, pudo haber ocurrido un posible vertido de una sentina o que se hayan derramado aguas residuales en un lugar cercano a las balsas de cultivo, ya que las aguas cloacales al ponerse en contacto con el agua de mar, se distribuyen, tanto en las capas superficiales como en toda la profundidad y a gran distancia de la orilla.

Las áreas de Bahía Iglesia y Punta Patilla presentaron los niveles más bajos, por lo que en ningún momento sobrepasaron las normas microbiológicas antes mencionadas. Hay que señalar que se observaron muchos valores nulos para estos grupos, en función a esto la literatura contiene muchas y variables explicaciones respecto a la viabilidad de bacterias entéricas en el agua de mar. Según Solo-Gabriele y col. [41], la disminución e inactivación microbiana es favorecida por el efecto de bacteriófagos específicos, radiación solar, salinidad, predación, disminución de nutrientes, antibiosis, acción de metales y variaciones del pH (fenómeno denominado auto depuración del medio receptor).

El análisis de varianza realizado a los resultados de CT y CF demostró que existen diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los recuentos de CF en las tres estaciones, no así los resultados obtenidos entre los meses, pues no se encontraron diferencias significativas ($P < 0,05$). En el análisis *a posteriori* de Duncan para el 95% de confianza, se encontró que esa diferencia es debida a la zona de la Ensenada La Chica, conformando las otras dos zonas un grupo homogéneo (FIG. 4). Lo que permite inferir que la Ensenada La Chica es la que presenta impactos contaminantes significativos, debido a las posi-

bles descargas puntualizadas cercanas a las balsas de cultivo de mejillones. Por su parte, Bahía Iglesia y Punta Patilla al obtener los valores más bajos, pudiera significar que en esas zonas no existen impactos contaminantes importantes y/o constantes. En general, todas estas áreas pudieran llegar a contaminarse de una manera intensa debido a una combinación de eventos meteorológicos, hidrográficos o de otra naturaleza.

Con el objeto de establecer la relación entre los análisis bacteriológicos con algunas variables físico-químicas, fueron tomadas como referencia los datos de temperatura, salinidad y oxígeno disuelto en los puntos de muestreo (TABLA IV). Entre las variables físico-químicas observadas destaca el patrón estacional de la temperatura y la poca variación de la salinidad. De las variaciones térmicas se pueden definir, en este estudio, dos períodos: uno caracterizado por temperaturas relativamente altas entre agosto y diciembre 2003 (26-28°C), y otro de temperaturas relativamente bajas a partir de enero hasta abril, donde se observaron temperaturas menores a 25°C (FIG. 5). Este patrón de temperatura es típico en la zona, comportamiento que marca la estacionalidad del área [26]. El comportamiento de la salinidad mostró poca variación, mostrando un patrón más o menos constante en las zonas estudiadas, este parámetro fluctuó la mayor parte del año entre 36 y 38 ‰, lo cual puede deberse a la poca cantidad de aportes fluviales y de canales que limiten la circulación del agua y al elevado intercambio y mezcla por efecto mareal [28, 35]. A diferencia de las variables anteriores, la concentración de oxígeno disuelto presentó oscilaciones muy marcadas durante el año de muestreo con valores inferiores al mínimo permitido (5 mL/L O₂) en la Gaceta Oficial Nº 5.021 para aguas tipo 3 [37]. Se tiene que

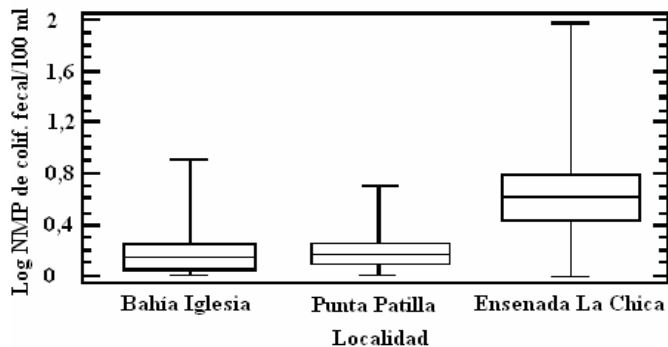


FIGURA 4. VALORES PROMEDIO DE COLIFORMES FECALES EN MUESTRAS DE AGUA PARA LAS ESTACIONES DE MUESTREO/ AVERAGE VALUES OF FECAL COLIFORMS IN WATER SAMPLES FROM THE SAMPLING STATIONS.

**TABLA IV
VALORES EXTREMOS OBSERVADOS DE TEMPERATURA (°C), SALINIDAD (‰) Y OXÍGENO DISUELTO (mL/L) EN TRES ÁREAS DE PRODUCCIÓN DE MEJILLONES DEL ESTADO SUCRE/ EXTREME OBSERVED VALUES IN TEMPERATURE (°C), SALINITY (‰) AND DISSOLVED OXYGEN (mL/L) IN THREE MUSSELS PRODUCTION GROUNDS OF SUCRE STATE.**

Localidad		Temperatura (°C)	Salinidad (‰)	Ox. Disuelto (ml/l)
Ensenada La Chica	Mínimo	24	36	3,89
	Máximo	28	38	6,40
	Promedio	26,10	37	4,60
Bahía Iglesia	Mínimo	24,2	36	2,82
	Máximo	27,5	38	5,47
	Promedio	25,3	37	3,85
Punta Patilla	Mínimo	24,2	36	3,84
	Máximo	27,8	38	7,00
	Promedio	25,7	37	4,64

en la Ensenada La Chica, el margen de variación fue de 3,89 a 6,75 mL O₂/L, observándose los máximos valores en los meses de julio y agosto 2004. En Punta Patilla, la concentración osciló entre 3,84 a 7 mL O₂/L, y al igual que en la Ensenada La Chica, los máximos se observan en julio y agosto del mismo año. Por otro lado, es importante destacar las bajas concentraciones de oxígeno de hasta 2,82 mL O₂/L, para agosto 2004, en Bahía Iglesia, registrándose el mayor valor (5,47 mL O₂/L) en marzo 2004. Estas bajas concentraciones de oxígeno indicarían su consumo por procesos de oxidación de materia orgánica [26].

Al aplicar un análisis de correlación múltiple, no se encontró correlación entre las poblaciones bacterianas estudiadas con los parámetros antes mencionados, posiblemente a que las variaciones en estas variables, durante los meses de

muestreo, fueron tan pequeñas que no se consideraron estadísticamente significativas, lo que sugiere que en las zonas estudiadas, las condiciones climáticas no son realmente un factor determinante en los niveles de los indicadores de contaminación. Al respecto varios autores señalan que sería necesario tomar en cuenta otros parámetros como son las corrientes marinas, los vientos, la profundidad de la zona así como también la presencia de descargas sépticas en las cercanías, las cuales podrían influir en la permanencia de coliformes en las áreas estudiadas [20, 34]. Esta escasa relación también haría suponer, que la variación de estas poblaciones bacterianas no se puede explicar exclusivamente en base a un parámetro ambiental; más bien, es la interacción de todos los conjuntos ambientales, con su variación espacio-temporal, lo que va a moldear el comportamiento de esas bacterias en el medio [20].

Identificación bioquímica de bacterias coliformes

Las características fenotípicas de las colonias desarrolladas en los agares selectivos y diferenciales, fueron muy diversas. De forma general, se observaron colonias hasta con un diámetro de 6 mm, aproximadamente. Las formas y colores fueron también muy variadas, encontrándose colonias redondeadas, ovaladas, con bordes regulares e irregulares (ésta última con aspecto mucoso), de superficies planas, cóncavas o convexas, anaranjadas, rosadas, rojizas, incoloras con centro negro, negras, púrpuras con centro rosado, moradas, algunas de las cuales impartían su coloración al medio de cultivo. Se identificaron un total de 246 cepas, de las cuales 159 fueron aisladas a partir de muestras de mejillones y 87 cepas aisladas a partir de muestras de agua, todo esto en función de pruebas bioquímicas diferenciales basadas en la actividad metabólica de cada especie de microorganismo aislado (TABLA V). Se observó que la diversidad fue mayor en mejillones, en comparación con el agua, este incremento está relacionado con la capacidad concentradora de los bivalvos al filtrar partículas en suspensión en el medio que los rodea a través del bombeo del agua, factor que incide 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; en fin, son los bivalvos los que logran revelar la condición bacteriológica del agua donde se encuentran [21].

Algunas de estas especies fueron aisladas con poca frecuencia durante el año de muestreo, y probablemente se encuentren en bajo número. Su presencia debe servir de advertencia, puesto que su número puede estar asociado con la incidencia de infección en la población humana, y como tal, puede aumentar inesperadamente constituyendo un inminente riesgo para la salud pública. En varios trabajos [7, 17, 45], se aislaron también estas especies bacterianas en otros bivalvos y en agua, y se puso de manifiesto su contaminación de origen fecal como es el caso que ocupa esta investigación.

Los resultados obtenidos en la presente investigación hacen suponer que, existen ciertas interferencias ambientales

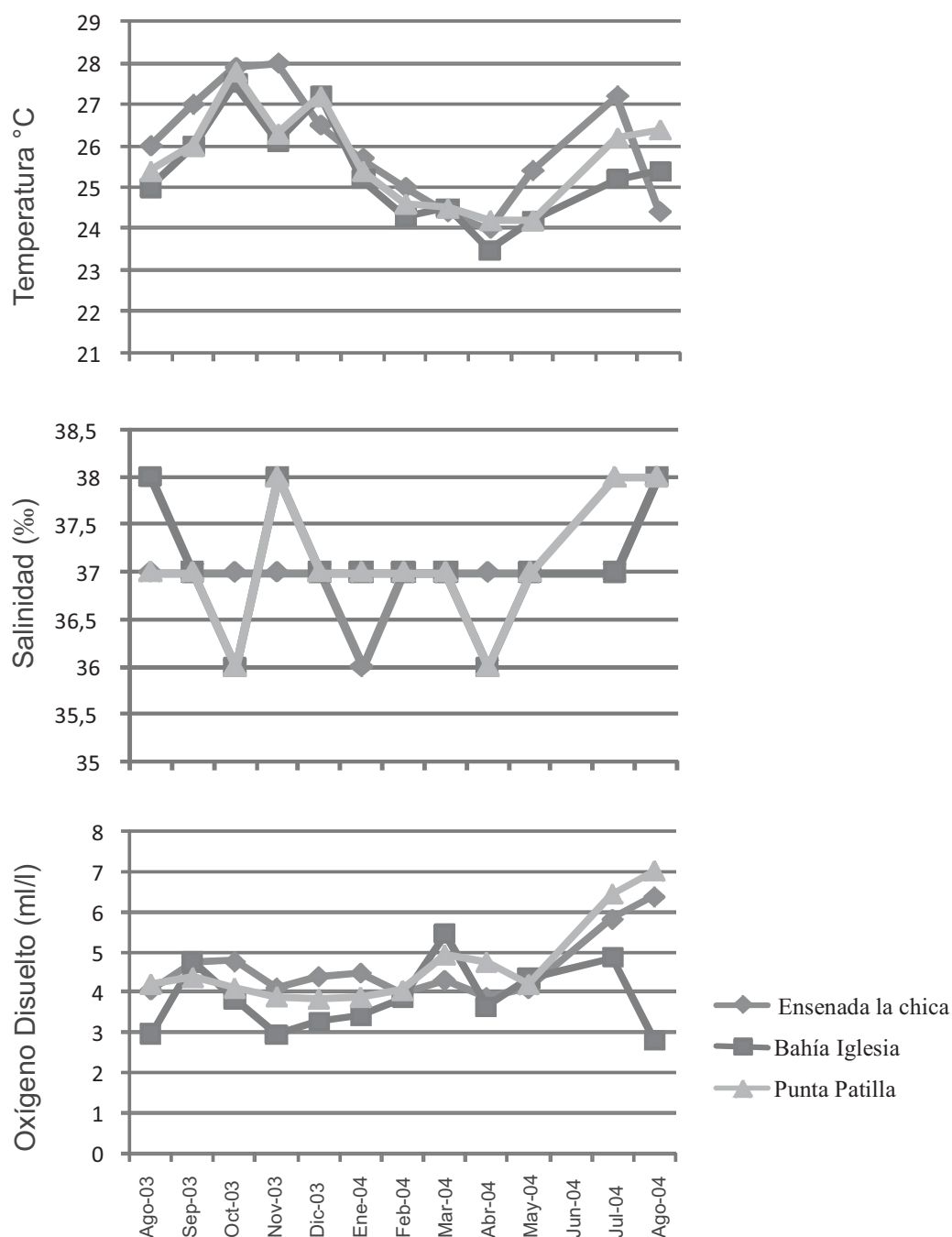


FIGURA 5. VARIACIÓN MENSUAL DE LA TEMPERATURA (°C), SALINIDAD (‰) Y OXÍGENO DISUELTO (ml/l) DEL AGUA EN TRES ÁREAS DE PRODUCCIÓN DE MEJILLONES DEL ESTADO SUCRE/ MONTHLY VARIATION OF THE TEMPERATURE (°C), SALINITY (‰) AND DISSOLVED OXYGEN (ml/l) IN WATER FROM THREE MUSSELS PRODUCTION GROUNDS OF SUCRE STATE.

en la microbiología de las aguas y posiblemente en la capacidad de filtración de los mejillones. Este hecho enfatiza la importancia del monitoreo continuo del producto, posibilitando el aumento de la producción y/o extracción de los mejillones, junto con la determinación de la calidad del agua en los bancos naturales estudiados y posteriormente, el de los mejillones comercializados.

CONCLUSIONES

La mayoría de las muestras analizadas de mejillones, procedentes de la Ensenada La Chica, presentaron valores por encima de los límites establecidos por la Legislación Sanitaria Venezolana y la FDA, para los niveles de coliformes fecales y *E. coli*.

TABLA V
**ESPECIES BACTERIANAS PERTENECIENTES A LA
 FAMILIA ENTEROBACTERIACEAE AISLADAS E
 IDENTIFICADAS A PARTIR DE MUESTRAS DE
 MEJILLONES Y AGUAS PROCEDENTES DE TRES ÁREAS
 DE PRODUCCIÓN DEL ESTADO SUCRE/ BACTERIAL
 SPECIES BELONGING TO THE FAMILY ENTEROBACTERIACEAE
 ISOLATED AND IDENTIFIED FROM MUSSEL AND WATER SAMPLES
 FROM THREE PRODUCTION GROUNDS OF SUCRE STATE.**

Mejillones	Agua
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>
<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>
<i>Enterobacter agglomerans</i>	
<i>Citrobacter freundii</i>	
<i>Proteus mirabilis</i>	
<i>Proteus vulgaris</i>	
<i>E. coli</i>	
<i>Salmonella</i> spp.	

Los mejillones procedentes de Bahía Iglesia y Punta Paitilla se encontraron dentro de las regulaciones antes mencionadas, por lo que se puede valorar su calidad como satisfactoria para los niveles de contaminación fecal.

Se logró detectar *Salmonella* en los mejillones procedentes de la Ensenada La Chica, sólo en el mes de octubre, lo que pudiera significar una fuente de contaminación puntual.

AGRADECIMIENTO

Al Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA) y al Instituto Nacional de pesca y Acuicultura (INAPESCA) por haber financiado esta investigación a través del proyecto 02-612-17005-003.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Standard Methods for the examination of water and wastewater**. 17th. Ed. APHA. AWWA. Washington, D.C., U.S.A. 1.220 pp. 1989.

[2] AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Compendium of methods for the microbiological examination of food**. C. Vanderzant and D.F. Splittatoesser (Eds.). Washington, D.C. U.S.A. 1.134 pp. 1992.

[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 (4): 1544-1552. 2000.

[4] BENITEZ, J.; OKUDA, T. Variación estacional de las diversas formas de nitrógeno en el golfo de Cariaco, Venezuela. **Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela Univ. Oriente.** 24 (1-2): 185-198. 1985.

[5] BURKHARDT, W.; CALCI, K. Selective accumulation may account for shellfish-associated viral illness. **Appl. Environ. Microbiol.** 66 (4): 1375-1378. 2000.

[6] BRANDS, D.; INMAN, A.; GERBA, C.; MARÉ, J.; BILLINGTON, S.; SAIF, L.; LEVINE, J.; JOENS, L. Prevalence of *Salmonella* spp. in oysters in the United States. **Appl. Environ. Microbiol.** 7 (2): 893-897. 2005.

[7] BLANCO, H.; NORDELO, M.; EXPÓSITO, N.; VARGAS, B. Coliformes en medios marinos de áreas protegidas con presencia significativa de aves: ¿indicadores de contaminación? Caso de estudio: Parque Nacional Archipiélago Los Roques. **Rev. Fac. Ing. de la UCV.** 19(1): 21-27. 2004.

[8] CANESI, L.; PRUZZO, C.; TARSE, R.; GALLO, G. Surface interactions between *Escherichia coli* and hemocytes of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* Lam. leading to efficient bacterial clearance. **Appl. Environ. Microbiol.** 67 (1): 464-468. 2001.

[9] COVENIN (1126-89). **Alimentos. Codificación y preparación de muestras para el análisis microbiológico**. Comisión Venezolana de Normas Industriales. Ministerio de Fomento. 7 pp. 1989.

[10] COVENIN (902-87). **Método para recuento de microorganismos aerobios mesófilos en placas de petri**. Comisión Venezolana de Normas Industriales. Ministerio de Fomento. 7 pp. Caracas. 1987.

[11] COVENIN (1104-96). **Determinación del Número Más Probable de coliformes, coliformes fecales y de E. coli**. Comisión Venezolana de Normas Industriales. Ministerio de Fomento. 20 pp. Caracas. 1996.

[12] CORTÉS-LARA, M. Importancia de los coliformes fecales como indicadores de contaminación en la Franja Litoral de Bahía de Banderas, Jalisco-Nayarit. **Rev. Biomed.** 14: 121-123. 2003.

[13] DAVIES, C.; LONG, J.; DONALD, M.; ASHBOLT, N. Survival of fecal microorganisms in marine and freshwater sediments. **Appl. Environ. Microbiol.** 61(5): 1888-1896. 1995.

[14] Food and Drug Administration (F.D.A.). **Sanitation of shellfish growing areas. National Shellfish Sanitation Program**. Manual of operations. Part. 1. U.S. Dep. of Health and Human Services. Public Health Service. Washington, D.C., U.S.A. 1990 a.

[15] 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. Washington, D.C., U.S.A. 1990 b.
- [16] FICA, A.; FERNANDEZ, A.; PRAT, S.; FIGUEROA, O.; GAMBOA, R.; TSUNEKAWA, I.; HEITMANN, I. *Salmonella enteritidis*, un patógeno emergente. **Rev. Med. Chil.** 125: 544-551. 1997.
- [17] 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.
- [18] FLORES, C. Actualidad y perspectiva del espacio marino costero con énfasis en la realidad venezolana. **Bol. Inst. Oceanogr. Venez. Univ. Oriente.** 38 (1): 110-118. 1999.
- [19] 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. Venez. Univ. Oriente.** 38 (1): 42-43. 1999.
- [20] GRAÜ DE M., C.; LA BARBERA, A.; SÁNCHEZ, D.; ZERPA, A. Evaluación de la condición sanitaria de los moluscos *Arca zebra*, *Perna perna* y *Crassostrea virginica* procedentes de los bancos naturales del estado Sucre. **I Simposium in memoriam Francisco López Capont. "El futuro de la industria pesquera en un mundo globalizado"**. Universidad Santiago de Compostela, 28-30 Octubre, España. 15-17 pp. 2002.
- [21] 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.
- [22] HUNT, D. A.; MIESCIER, J.; REDMAN, J.; SALINGER, A.; LUCAS, J. Molluscan shellfish, fresh frozen oyster, mussels or clams. Cap. 43. En: **Compendium of methods for the microbiological examination of foods.** 2nd Ed. Marvin L. Speck, (Ed.). Washington, D. C., U.S.A. 590-610 pp. 1976.
- [23] 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.** 148: 93-108. 1997.
- [24] IRIARTE, M. Indicadores bacterianos en las aguas y en el guacuco (*Tivela mactroides*) de la Ensenada de La Guardia, Isla de Margarita. **Mem. Soc. Cienc. Nat. La Salle.** 15: 85-95. 1999.
- [25] KONEMAN, E.; ALLEN, S.; DAWELL, V.; JANDA, W.; SOMMERS, H. Y WINN, W. Enterobacteriaceae. In: **Diagnóstico Microbiológico.** Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires. 200-210 pp. 1992.
- [26] LA BARBERA-SÁNCHEZ, A.; GAMBOA, J.; SENIOR, W. Fitoplancton del golfo de Cariaco, estado Sucre, Venezuela. **Rev. Biol. Trop.** 47 (supl. 1): 57-63. 1999.
- [27] MAC FADDIN, J. **Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica.** Editorial Panamericana. Buenos Aires-Argentina. 301 pp. 1980.
- [28] MARIN, B.; LODEIROS, C.; FIGUEROA, D.; MARQUEZ, B. Distribución vertical y abundancia estacional del microzooplancton y su relación con los factores ambientales en Turpialito, golfo de Cariaco, Venezuela. **Rev. Científ. FCV-LUZ.** XIV (2): 133-139. 2004.
- [29] MARTÍNEZ-URTAZA, J.; SACO, M.; DE NOVOA, J.; PÉREZ-PIÑEIRO, P.; PEITEADO, J.; LOZANO-LEÓN, A.; GARCIA-MARTIN, O. Influence of environmental factors and human activity on the presence of *Salmonella* serovars in a marine environment. **Appl. Environ. Microbiol.** 70 (4): 2089-2097. 2004.
- [30] MARTÍNEZ, C.; GRAÜ DE M., C.; VILLALOBOS DE B., L.; MUÑOZ, D.; ZERPA, A. Calidad microbiológica del guacuco (*Tivela mactroides*) y del agua en playa Güiría, estado Sucre, Venezuela. LIV Convención Anual ASOVAC. **Acta Cient. Venez.** 55 (Supl. 1): 178. 2004.
- [31] MERCK. Otros preparados y productos auxiliares. **Manual de medios de cultivos.** Darmstadt, Alemania. 308-309 pp. 1994.
- [32] MINISTERIO DE AGRICULTURA Y CRÍA (MAC), Servicio Autónomo de los Recursos Pesqueros y Acuicola-SARPA. Providencia Nº 3 del 18-03-98: Normas para ejercer controles sanitarios y supervisión de la producción de moluscos bivalvos. Providencia Nº 4 del 18-03-98: Condiciones sanitarias aplicables a los moluscos bivalvos vivos. Gaceta Oficial 36.429 del 6-4-98. Caracas, D.F. Venezuela. 303.927 pp. 1998 a.
- [33] MINISTERIO DE AGRICULTURA Y CRÍA (MAC), Servicio Autónomo de los Recursos Pesqueros y Acuicola-SARPA. Providencia Nº 8 del 18-03-98: Zonas aptas para la producción de moluscos bivalvos. Gaceta Oficial 36.430 del 7-4-98. Caracas, D.F. Venezuela. 303.949 pp. 1998 b.
- [34] NARVÁEZ, A. *Escherichia coli*, especies de *Vibrio* enteropatógenas y *Listeria monocytogenes* en los moluscos bivalvos mejillón y pepitonas extraídos de los bancos naturales Guaca-Guatapanare y Chacopata del estado Sucre. Facultad Experimental de Ciencias, la universidad del Zulia, Maracaibo. Tesis de Maestría. 84 pp. 2003.
- [35] OKUDA, T.; BENITEZ, A.; BONILLA, J.; CEDEÑO, G. Características hidrográficas del golfo de Cariaco, Venezuela. **Bol. Inst. Oceanogr. Venez. Univ. Oriente.** 17 (1-2): 69-88. 1978.

- [36] POLO, F.; FIGUERA, M.; INZA, I.; SALA, J.; FLEISHER, J.; GUANO, J. Relationship between the presence of *Salmonella* and indicators of faecal pollution in aquatic habitats. **FEMS Microbiol. Lett.** 160: 253-256. 1998.
- [37] REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA, Gaceta Oficial N° 5.021 Extraordinario, del 18-12-1995. Decreto 883 del 11-10-95. **Normas para la clasificación y el control de la calidad de los cuerpos de agua y vertidos o efluentes líquidos.** Caracas, D.F. Venezuela. 4 pp. 1995.
- [38] REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA, Gaceta Oficial N° 30.440. Ministerio de Agricultura y Cría (MAC). Resolución N° 344 Extraordinario, del 04-07-1974. **Normas para actividades de captura, transporte y comercialización de moluscos bivalvos desde los centros y/o sitios de recolección.** Caracas, D.F. Venezuela. 4 pp. 1974.
- [39] SEGNINI, M.; CHUNG, K.; PÉREZ, J. Salinity and temperature tolerances of the green and brown mussels, *Perna viridis* and *Perna perna* (Bivalvia: Mytilidae). **Rev. Biol. Trop.** 46(5): 121-125. 1998.
- [40] SOKAL, R.; ROHLF, F. **Biometry: Principios y Métodos Estadísticos en la Investigación Biológica.** W. H. Freeman and Company. San Francisco. U.S.A. 779 pp. 1981.
- [41] SOLO-GABRIELLE, H.; WOLFERT, M.; DESMARAIS, T.; PALMER, C. Sources of *Escherichia coli* in a coastal subtropical environment. **Appl. Environ. Microbiol.** 66 (1): 230-237. 2000.
- [42] STRICKLAND, J.; PARSON, R. A practical handbook of sea water analysis. **Bull. Fish. Res. Bd. Canada.** 169: 1-310. 1972.
- [43] TEJERA, E.; OÑATE, I.; NÚÑEZ, M.; LODEIROS, C. Crecimiento inicial del mejillón marrón (*Perna perna*) y verde (*Perna viridis*) bajo condiciones de cultivo suspendido en el Golfo de Cariaco, Venezuela. **Bol. Centro Inv. Biol.**, 34(2): 143-158. 2000.
- [44] VILLALOBOS, DE B. L. B.; ELGUEZÁBAL, L.; SÁNCHEZ, I. Efecto de la precipitación atmosférica en la calidad sanitaria del bivalvo *Pinctada imbricata* comercializado en Cumaná, estado Sucre. XLVII convención anual de la AsoVAC. **Acta Cient. Venez.** 48 (Supl. 1): 144. 1997.
- [45] VILLALOBOS, L.; ELGUEZÁBAL, L. Microbiological quality of the bivalve *Pinctada imbricata* commercialized in Cumaná, Venezuela. **Acta Cient. Ven.** 52 (1): 55-61. 2001.
- [46] WINFIELD, M.; GROISMAN, E. Role of nonhost environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. **Appl. Environ. Microbiol.** 69 (7): 3687-3694. 2003.