

**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
DE LA ZONA SUROESTE DE PUERTO RICO**

Por

Yaritza Fontáñez Barris

Tesis sometida en cumplimiento parcial de los requisitos para el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

en

Ciencia y Tecnología de Alimentos

**UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO
RECINTO UNIVERSITARIO DE MAYAGÜEZ
2005**

Aprobado por:

John Kubaryk, Ph.D.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Francisco Fuentes, Ph.D.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Mildred Chaparro, Ph.D.
Presidenta, Comité Graduado

Fecha

Dimaris Acosta, Ph.D.
Representante de Estudios Graduados

Fecha

Edna Negrón, Ph.D.
Directora del Departamento

Fecha

Abstract

The microbiological profile of the clam, the mangrove oyster, and their harvesting waters in the southwestern zone of Puerto Rico, was determined by the analysis of fecal coliforms, *Salmonella* spp., *Vibrio* spp., and total plate count. Samples were collected from two areas of the southwest of P.R. (Boquerón and Lajas) between the months of July 2003 to June 2004. Density of fecal coliforms were found to range between 0.48-1.97 log₁₀ cfu g⁻¹ or ml⁻¹; whereas, the density of vibrios were between 0.48-5.04 log₁₀ cfu g⁻¹ or ml⁻¹. Total counts fluctuated between 2.40-5.61 log₁₀ cfu g⁻¹ or ml⁻¹. *Salmonella* was not detected in any of the samples. The majority of the samples were in compliance with the regulations of the National Shellfish Sanitation Program (NSSP). No significant correlation was found between the density of vibrios and salinity, pH, dissolved oxygen or temperature.

Resumen

Se determinó el perfil microbiológico de la almeja, del ostión de mangle y las aguas de extracción de bivalvos de la zona suroeste de Puerto Rico mediante el análisis de coliformes fecales, *Salmonella* spp., *Vibrio* spp. y el recuento total en platos. Se recolectaron muestras de dos áreas del suroeste de P.R. (Boquerón y Lajas) entre los meses de julio de 2003 a junio de 2004. Se encontraron densidades de coliformes fecales entre 0.48-1.97 $\log_{10}$ ufc g^{-1} o ml^{-1} . Las densidades de vibrios estuvieron entre 0.48-5.04 $\log_{10}$ ufc g^{-1} o ml^{-1} . Los recuentos totales fluctuaron entre 2.40-5.61 $\log_{10}$ ufc g^{-1} o ml^{-1} . No se detectó la presencia de *Salmonella* en ninguna de las muestras. La mayoría de las muestras estuvieron en cumplimiento con las regulaciones de la “National Shellfish Sanitation Program (NSSP)”. No se detectó una correlación significativa entre las densidades de vibrios y las variables físico-químicas como la salinidad, el pH, la concentración de oxígeno disuelto o la temperatura.

**Derechos de Autor Reservados©
Yaritza Fontáñez Barris
2005**

Dedicatoria

A **Jesús**, mi Dios y fortaleza, este trabajo fue producto de ti. A mi ángel guardián por su protección, dedicación y sobre todo su amor incondicional. ¡Gracias por siempre estar cerca de mí! A mi familia por el apoyo y carácter que me han ofrecido a lo largo de toda mi vida, me inspiraron más de lo que se pueden imaginar. Me enseñaron que lo importante es hacer lo mejor que se pueda en todo lo que hago. ¡Gracias, los amo! A mis amistades sinceras, el saber siempre que podía contar con ustedes me dio ánimo. Comprendí que los verdaderos amigos son difíciles de encontrar, fáciles de querer e imposibles de olvidar. ¡Ustedes son los mejores!

Para todos ustedes éste es mi regalo de amor, es nuestro momento de gloria.

Dios mío: ¡Valió la pena el sacrificio!

Agradecimientos

Deseo agradecer a los miembros de mi comité graduado por su interés en formar parte del mismo. Gracias Dr. John Kubaryk por su ayuda en la recolección de los organismos y por los equipos de laboratorio que me prestó. Además agradezco al Dr. Francisco Fuentes por su dedicación y esmero en esta investigación. En especial, le ofrezco sinceramente **GRACIAS** a la Dra. Mildred Chaparro por su tiempo, cooperación, guía y enseñanzas durante todo este tiempo. ¡Usted es mi ejemplo a seguir!

Agradezco al Programa de Ciencia y Tecnología de Alimentos del Recinto Universitario de Mayagüez de la Universidad de Puerto Rico por permitirme ser parte de su grupo de estudiantes graduados. Extiendo mi agradecimiento a todas aquellas personas que de alguna manera lograron que este proyecto fuera realidad. Ellos son el Sr. Richard Martín por su colaboración al recolectar los bivalvos, el Agro.Carlos M. Agurcia por su apoyo técnico. También agradezco a la Sra. Magaly Zapata por aportar sus conocimientos en la parte práctica y la Sra. Mary Jiménez por contribuir en la fase administrativa de esta investigación. Por último, agradezco a la Dra. Dimaris Acosta por la ayuda brindada en el análisis estadístico de la tesis.

Destaco al programa Sea Grant del Recinto Universitario de Mayagüez de la Universidad de Puerto Rico por brindar los fondos necesarios para llevar a cabo esta investigación (**Grant Project Number R-51-1-02**). Sin su apoyo económico jamás hubiera sido posible este proyecto. ¡**Gracias!**

Finalmente, gracias a Dios y a la Virgen María por permitirme gozar de buena salud y disposición durante el tiempo necesario para completar esta investigación. ¡Estoy muy agradecida de todas las bendiciones que me han otorgado!

Tabla de Contenido

Lista de Tablas	x
Lista de Figuras	xi
Lista de Apéndices	xii
Introducción	1
Revisión de Literatura	5
Materiales y Métodos	16
I. Recolección de la muestra	16
II. Procesamiento de la muestra	16
III. Análisis bacteriológico de la carne y el licor	17
IV. Aislamiento de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> y <i>Vibrio vulnificus</i>	17
V. Aislamiento de coliformes fecales	19
VI. Procedimiento para el aislamiento de especies de <i>Salmonella</i>	20
VII. Recuento total aeróbico en platos	21
VIII. Análisis bacteriológico del agua de extracción de bivalvos	22
IX. Análisis estadístico	22
Resultados	24
I. Densidad de vibrios en bivalvos y en las aguas de extracción de la zona suroeste de Puerto Rico	24
II. Densidad de coliformes fecales en bivalvos y en las aguas de extracción de la zona suroeste de Puerto Rico	30
III. Aislamiento de <i>Salmonella</i> en bivalvos y en las aguas de extracción de la zona suroeste de Puerto Rico	35
IV. Recuento total aeróbico en bivalvos y en las aguas de extracción de la zona suroeste de Puerto Rico	36

V.	Parámetros físico-químicos de las aguas de extracción de bivalvos de Boquerón y Lajas	41
	Discusión	43
	Conclusiones	47
	Recomendaciones	48
	Apéndices	49
	Literatura Citada	64

Lista de Tablas

Tabla 1. Densidad de vibrios en ostiones (<i>Crassostrea rhizophorae</i>) y en las aguas de extracción del suroeste de Puerto Rico durante el período de julio de 2003 a junio de 2004	25
Tabla 2. Densidad de vibrios en almejas (<i>Lucina pectinata</i>) y en las aguas de extracción del suroeste de Puerto Rico durante el período de julio de 2003 a junio de 2004	27
Tabla 3. Abundancia relativa de vibrios en bivalvos y en las aguas de extracción de la zona suroeste de Puerto Rico durante el período de julio de 2003 a junio de 2004	29
Tabla 4. Densidad de coliformes fecales en ostiones (<i>Crassostrea rhizophorae</i>) y en las aguas de extracción del suroeste de Puerto Rico durante el período de julio de 2003 a junio de 2004	31
Tabla 5. Densidad de coliformes fecales en almejas (<i>Lucina pectinata</i>) y en las aguas de extracción del suroeste de Puerto Rico durante el período de julio de 2003 a junio de 2004	33
Tabla 6. Microorganismos aislados mediante el protocolo de recuperación de <i>Salmonella</i> en bivalvos y en las aguas de extracción de la zona suroeste de Puerto Rico durante el período de julio de 2003 a junio de 2004	35
Tabla 7. Recuentos totales aeróbicos en ostiones (<i>Crassostrea rhizophorae</i>) y en las aguas de extracción del suroeste de Puerto Rico durante el período de julio de 2003 a junio de 2004	37
Tabla 8. Recuentos totales aeróbicos en almejas (<i>Lucina pectinata</i>) y en las aguas de extracción del suroeste de Puerto Rico durante el período de julio de 2003 a junio de 2004	39
Tabla 9. Parámetros físico-químicos en el agua de extracción de ostiones de la zona a suroeste de Puerto Rico durante el período de julio de 2003 a junio de 2004	41
Tabla 10. Parámetros físico-químicos en el agua de extracción de almejas de la zona suroeste de Puerto Rico durante el período de julio de 2003 a junio de 2004	42

Lista de Figuras

Figura 1. Densidad de vibrios en ostiones (<i>Crassostrea rhizophorae</i>) y en las aguas de extracción del suroeste de Puerto Rico durante el período de julio de 2003 a junio de 2004.	26
Figura 2. Densidad de vibrios en almejas (<i>Lucina pectinata</i>) y en las aguas de extracción del suroeste de Puerto Rico durante el período de julio de 2003 a junio 2004.	28
Figura 3. Densidad de coliformes fecales en ostiones (<i>Crassostrea rhizophorae</i>) en las aguas de extracción del suroeste de Puerto Rico durante el período de julio de 2003 a junio de 2004.	32
Figura 4. Densidad de coliformes fecales en almejas (<i>Lucina pectinata</i>) y en las aguas de extracción del suroeste de Puerto Rico durante el período de julio de 2003 a junio de 2004.	34
Figura 5. Recuentos totales aeróbicos en ostiones (<i>Crassostrea rhizophorae</i>) y en las aguas de extracción del suroeste de Puerto Rico durante el período de julio de 2003 a junio de 2004.	38
Figura 6. Recuentos totales aeróbicos en almejas (<i>Lucina pectinata</i>) y en las aguas de extracción del suroeste de Puerto Rico durante el período de julio de 2003 a junio de 2004.	40

Lista de Apéndices

Apéndice 1. Enfermedades entéricas de notificación obligatoria en Puerto Rico, 1999-2003	50
Apéndice 2. Mapa geográfico de las áreas de muestreos ubicadas en Cabo Rojo y Lajas, Puerto Rico	51
Apéndice 3. Densidad de <i>Vibrio</i> spp. mediante el uso de la técnica del NMP en los ostiones (<i>Crassostrea rhizophorae</i>) y en el agua de extracción de Boquerón, Puerto Rico durante el período de julio 2003 a junio de 2004	52
Apéndice 4. Densidad de <i>Vibrio</i> spp. mediante el uso de la técnica del NMP en los ostiones (<i>Crassostrea rhizophorae</i>) y en el agua de extracción de Lajas, Puerto Rico durante el período de julio 2003 a junio de 2004	53
Apéndice 5. Densidad de <i>Vibrio</i> spp. mediante el uso de la técnica del NMP en las almejas (<i>Lucina pectinata</i>) y en el agua de extracción de Boquerón, Puerto Rico durante el período de julio 2003 a junio de 2004	54
Apéndice 6. Densidad de <i>Vibrio</i> spp. mediante el uso de la técnica del NMP en las almejas (<i>Lucina pectinata</i>) y en el agua de extracción de Lajas, Puerto Rico durante el período de julio 2003 a junio de 2004	55
Apéndice 7. Densidad de coliformes fecales mediante el uso de la técnica del NMP en los ostiones (<i>Crassostrea rhizophorae</i>) y en el agua de extracción de Boquerón, Puerto Rico durante el período de julio 2003 a junio de 2004	56
Apéndice 8. Densidad de coliformes fecales mediante el uso de la técnica del NMP en los ostiones (<i>Crassostrea rhizophorae</i>) y en el agua de extracción de Lajas, Puerto Rico durante el período de julio 2003 a junio de 2004	57
Apéndice 9. Densidad de coliformes fecales mediante el uso de la técnica del NMP en las almejas (<i>Lucina pectinata</i>) y en el agua de extracción de Boquerón, Puerto Rico durante el período de julio 2003 a junio de 2004	58
Apéndice 10. Densidad de coliformes fecales mediante el uso de la técnica del NMP en las almejas (<i>Lucina pectinata</i>) y en el agua de extracción de Lajas, Puerto Rico durante el período de julio 2003 a junio de 2004	59
Apéndice 11. Recuentos totales aeróbicos en los ostiones (<i>Crassostrea rhizophorae</i>) y en el agua de extracción de bivalvos de la zona suroeste de Puerto Rico durante el período de julio 2003 a junio de 2004	60

Apéndice 12. Recuentos totales aeróbicos en almejas (<i>Lucina pectinata</i>) y en el agua de extracción de bivalvos de la zona suroeste de Puerto Rico durante el período de julio 2003 a junio de 2004	61
Apéndice 13. Análisis estadísticos de correlación entre la densidad de vibrios y las variantes físico-químicas de las zonas de extracción	62

Introducción

Los productos pesqueros que se ingieren crudos pueden acarrear riesgos para la salud del consumidor si no se toman precauciones antes de su ingesta. En Puerto Rico es común el consumo de mariscos crudos como la almeja (*Lucina pectinata* Gmelin, 1791) y el ostión de mangle (*Crassostrea rhizophorae* Guilding, 1828) especialmente en la región suroeste. Éstos son del agrado del público y se encuentran ampliamente distribuidos en el área. Los ostiones son habitantes naturales del mangle rojo (*Rhizophora mangle*) donde se localizan adheridos a la superficie de las raíces. Las almejas se encuentran en el fondo de estas áreas costeras. Estos bivalvos son capaces de concentrar microorganismos en su interior debido a que se alimentan por mecanismos de filtración no selectiva, y como consecuencia, pueden ser reservorios de patógenos (20). Los ostiones y las almejas podrían acumular ciertos microorganismos de la familia Vibrionaceae, tales como *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus*, los cuales son patógenos para el ser humano. Si el manglar está contaminado con materia de origen fecal pueden encontrarse en el interior de los bivalvos microorganismos como *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Escherichia coli* y virus entéricos (20). Todos estos microorganismos al igual que otras bacterias patógenas asociadas a alimentos tienen como principal síntoma clínico, una gastroenteritis (13).

En Puerto Rico carecemos de información empírica que nos dé un índice de la calidad microbiológica de mariscos que se consumen crudos, como por ejemplo, las almejas y los ostiones (25). Estos bivalvos se extraen con fines comerciales en el área suroeste de la isla específicamente en Boquerón y Lajas. La literatura ha evidenciado que estos organismos pueden ser vectores de bacterias y virus entéricos dado el modo de

alimentación que poseen (20). Anualmente se reportan miles de casos de vibriosis alrededor del mundo incluyendo países como la India, Bangladesh, Japón, Taiwán, América central, Suramérica y los Estados Unidos (59) donde el origen de la enfermedad se ha relacionado al consumo de ostiones crudos.

Según Cook y colaboradores (2002) (22), cada año en los Estados Unidos las especies de *Vibrio* causan alrededor de 5,000 infecciones donde *Vibrio parahaemolyticus* generalmente es la causa principal. Sin embargo, personas inmunocomprometidas, con problemas del hígado, hemacromatosis e insuficiencia renal corren mayor riesgo de adquirir vibriosis y podrían morir debido al consumo de ostiones crudos. Con frecuencia las infecciones causadas por vibrios no se reportan a las autoridades de salud pública por lo que la condición aparenta ser poco común y su incidencia es subestimada. Un estudio realizado en los Estados Unidos por Daniels y colaboradores en el 2000 (24) reveló 40 brotes de vibriosis entre 1973 y 1998 donde el agente etiológico fue *Vibrio parahaemolyticus*. Durante este período se reportaron 1,064 casos de vibriosis alrededor de la nación. Las víctimas se contagiaron al ingerir mariscos pobremente cocidos, entre ellos camarones, pulpo, cangrejo y langosta. Sin embargo, el mayor número de infecciones reportadas con *Vibrio parahaemolyticus* se atribuyó al consumo de ostiones crudos en el estado de Texas en el año 1998.

La mayoría de las áreas geográficas donde se reconoce la presencia de *Vibrio parahaemolyticus*, la densidad de este organismo sigue un ciclo estacional distinto, el cual varía con el tipo de zona climática. Generalmente los recuentos más altos de este microorganismo en bivalvos y las zonas de extracción se reportan en los meses

de verano. En las zonas templadas este fenómeno se correlaciona con la temperatura (1, 26, 27, 40, 42). Debido a que se ha evidenciado la poca variabilidad en la temperatura de las aguas costeras para las regiones tropicales la literatura sugiere que en éstas la densidad de vibrios se correlaciona con los incrementos en la salinidad del agua (36, 65). El aumento en la salinidad del agua se atribuye al alto índice de evaporación y la poca precipitación pluvial que existe en los trópicos durante los meses de verano (60). Este es el caso de Hawai, África e Indonesia. Se estima que el rango de salinidad óptimo que favorece el crecimiento de vibrios en la columna de agua oscila entre 16-42 partes por mil (7, 37).

Estudios previos muestran evidencia de la presencia de especies de *Vibrio* en los ostiones obtenidos del área comercial de Boquerón (32) y en los ostiones vendidos al detal en esa localidad (25). Sin embargo, no hay estudios sobre los niveles de vibrios en el agua de cosecha de estos bivalvos. Este estudio resulta de gran importancia debido a que establece la base científica para elaborar programas HACCP (“Hazard Analysis Critical Control Point”) que regulen el comercio de bivalvos en la isla. Además podría utilizarse para evaluar la posibilidad de cambios drásticos en las características ecológicas del ambiente de estos organismos y para predecir la incidencia de un brote de gastroenteritis relacionado al consumo de estos bivalvos.

A pesar del peligro potencial que representa el clima de Puerto Rico y considerando que no existen reglamentaciones que garanticen la calidad microbiológica de éstos bivalvos que se consumen crudos, es asombroso que no se hayan reportado casos de gastroenteritis atribuidos a su ingesta (29, 57) (Apéndice 1). Por las razones

anteriormente mencionadas el propósito principal de esta investigación radica en establecer el perfil microbiológico de la almeja, del ostión de mangle y de las aguas de extracción de bivalvos de la zona suroeste de Puerto Rico durante doce meses. Se llevaron a cabo procedimientos para aislar e identificar especies de *Vibrio*, *Salmonella* y coliformes fecales (*Escherichia coli*) en bivalvos y el agua de cosecha de Lajas y Boquerón. Además se llevo a cabo el recuento total aeróbico en platos. Estos datos podrían ser utilizados para crear un NSSP nativo (“puertorriqueñizado”) y así determinar si las aguas de extracción de bivalvos están dentro de los parámetros establecidos por el programa federal. Se tomaron medidas de parámetros físico-químicos como la temperatura, el pH, la salinidad y la concentración de oxígeno disuelto para correlacionar la densidad de vibrios con éstos.

Hipótesis

Por su posición geográfica, Puerto Rico presenta condiciones ambientales de carácter tropical lo cual favorece la prevalencia de vibrios en el ambiente marino y por ende, su posible presencia en bivalvos. Existe una alta posibilidad de encontrar abundancia de vibrios en las costas del suroeste de Puerto Rico durante todas las temporadas del año debido a que se evidenció la uniformidad de la temperatura para la isla. Estudios previos realizados en países tropicales evidencian que la densidad de vibrios se correlaciona con la salinidad del agua. Este estudio pretende corroborar tal correlación y establecer el perfil microbiológico de las zonas de extracción y bivalvos del suroeste de P.R.

Revisión de Literatura

El manglar es el equivalente costero del bosque selvático en tierra. Constituye un ecosistema único e irremplazable que se caracteriza no sólo por una increíble biodiversidad sino por su productividad (30). Los manglares son zonas de apareamiento, cría y hábitat de muchas especies como es el caso del ostión de mangle (*Crassostrea rhizophorae*) y la almeja (*Lucina pectinata*). Estos bivalvos son capaces de concentrar microorganismos en su interior debido a que se alimentan por mecanismos de filtración no selectiva. La habilidad de estos organismos para concentrar bacterias coliformes presentes en el agua de mar enfatiza la importancia en la salud pública de los bivalvos como agentes potenciales de infección entérica. En el interior de estos animales predominan los bacilos Gram negativos aunque también pueden encontrarse especies Gram positivos, pero en menor cantidad. La flora bacteriana más común en bivalvos está compuesta por *Pseudomonas* spp., *Alteromonas* spp., *Aeromonas* spp. y *Vibrio* spp. (55). La prevalencia de estas bacterias en bivalvos va a depender de la especie y fisiología del molusco, la genética del microorganismo y las condiciones ambientales del hábitat donde se encuentren.

Desde principios del siglo pasado numerosas investigaciones sobre microorganismos asociados a bivalvos se han publicado alrededor del mundo, debido a que algunos de éstos pueden ser patógenos. La mayoría de los estudios publicados se enfocan en miembros de la familia Vibrionaceae. Históricamente, *Vibrio cholerae* O1 había sido la especie de vibrios con mayor importancia a nivel de salud pública en mariscos (1, 33). Con el paso de los años se descubrieron nuevas especies que ocuparon

su lugar, entre éstas, *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus*. El estudio de Genthner (1999) (31) sugiere que algunas cepas de vibrios como *Vibrio parahaemolyticus* han creado resistencia a los mecanismos de defensa del ostión lo que asegura su prevalencia en éste.

Vibrio parahaemolyticus es un patógeno entérico que se transmite a humanos primordialmente a través del consumo de mariscos crudos o pobremente cocidos (27). Al igual que otros miembros del género *Vibrio* es Gram negativo, halofílico y se encuentra ampliamente distribuido alrededor del mundo. Este patógeno se considera la causa principal de gastroenteritis en mariscos a nivel mundial (26) y ocasionalmente se le relaciona con infecciones extra-intestinales (42). La duración aproximada de la enfermedad mejor conocida como vibriosis es de dos días con un período de incubación entre 4-96 horas luego de la ingestión del microorganismo (11). Se desconoce la dosis infectiva para adquirir vibriosis, sin embargo, personas inmunocomprometidas, o con problemas del hígado y mujeres embarazadas corren mayores riesgos de enfermarse. La vibriosis se desarrolla una vez la bacteria se aloja en el intestino delgado del hospedero y libera una toxina que aún no ha sido identificada (11). Los síntomas clásicos de este desorden son diarrea, náuseas, dolor abdominal, vómitos, dolor de cabeza, escalofríos y fiebre. Normalmente los síntomas clínicos de esta enfermedad desaparecen por sí solos (son auto-limitantes) y sólo una porción mínima de los casos reportados de *Vibrio parahaemolyticus* requieren hospitalización y tratamiento con antibióticos.

Vibrio parahaemolyticus fue aislado por primera vez y descrito como el agente etiológico de un brote en Osaka, Japón para el año 1950 (36). En esta epidemia

se reportaron 272 casos de las cuales 20 perdieron la vida al ingerir sardinas (*Engraulis japonica*) pobremente cocidas. Actualmente se han reportado brotes con *Vibrio parahaemolyticus* en Estados Unidos, Canadá, Bangladesh, India, Tailandia, Taiwán, Rusia, Vietnam, Perú, Japón y Nigeria (64). A pesar de la identificación de *Vibrio parahaemolyticus* como patógeno a mediados del siglo 20 en Japón, en Estados Unidos no se reportó ningún caso de vibriosis hasta el verano del 1971 en el estado de Maryland (4). En esta epidemia se confirmaron 320 casos de vibriosis, los cuales fueron atribuidos al consumo de cangrejo pobremente cocido. En agosto de 1972 ocurrió otro brote con *Vibrio parahaemolyticus* en un club cívico localizado en Covington, Louisiana. En esta epidemia se reportaron 1,200 casos de vibriosis al ingerir camarones pobremente cocidos (4). Todos los síntomas reportados fueron de origen gastrointestinal.

Aunque *Vibrio parahaemolyticus* es la causa principal de vibriosis en los Estados Unidos las epidemias con éste no eran frecuentes hasta el 1997 (23). Durante ese año ocurrió un brote de vibriosis que afectó las ciudades de Oregón, California, Washington y Columbia Británica (26, 41). El origen de la enfermedad se atribuyó al consumo de ostiones crudos. Durante esta epidemia se confirmaron 209 casos que culminaron en una muerte. Un año más tarde el mismo microorganismo provocó otra epidemia que afectó a 23 personas residentes de Connecticut, Nueva Jersey y Nueva York. Las víctimas se contagiaron al ingerir almejas y ostiones crudos provenientes de la bahía Oyster en Long Island, N.Y. (17, 26). Ese mismo año, 43 personas residentes de Washington se infectaron con *Vibrio parahaemolyticus* al ingerir ostiones crudos (todos los casos fueron confirmados mediante cultivos).

La epidemia más grande con *Vibrio parahaemolyticus* reportada en la historia de los Estados Unidos ocurrió en el año 1998 y se atribuyó al consumo de ostiones crudos provenientes de la bahía de Galveston, Texas (26). Se reportaron 416 casos, 98 de ellos confirmados mediante cultivos. Este brote se distinguió de otros debido a que en todas las muestras analizadas se identificó a *Vibrio parahaemolyticus* serotipo O3:K6. La cepa O3:K6 apareció en la India alrededor del año 1995 y es el serotipo común asociado a brotes con *Vibrio parahaemolyticus* en Asia (26). La confirmación de esta cepa en aguas estadounidenses alertó a las agencias federales y la industria de bivalvos sobre una posible pandemia. A raíz de esto, la NSSP generó guías y recomendaciones para la industria de bivalvos, las cuales fueron expuestas en la conferencia interestatal de higienización de bivalvos (ISSC por sus siglas en inglés) en el año 1999. Como parte de las estrategias de prevención se estableció monitorear la incidencia de *Vibrio parahaemolyticus* en las aguas de cosecha de bivalvos de los Estados Unidos (16).

Los mecanismos de patogenicidad que presenta *Vibrio parahaemolyticus* aún son desconocidos pero entre sus factores de virulencia se han identificado mecanismos de invasión con toxinas, enzimas de adherencia y la producción de una hemolisina termoestable (TDH) (52). De éstos, la producción de TDH se considera el más importante. Varios investigadores (44, 49, 51, 67) aislaron la TDH directamente de los filtrados de cultivos de cepas de *Vibrio parahaemolyticus* capaces de producir hemólisis en agar de Wagatsuma (un medio de cultivo que contiene sangre fresca humana o de conejos). Investigaciones epidemiológicas revelaron una asociación entre el fenómeno de Kanagawa (una hemólisis tipo beta en el medio de cultivo Wagatsuma) (KP) y la

capacidad del organismo para causar gastroenteritis (54, 59). El fenómeno de KP es inducido por la TDH que producen exclusivamente cepas patogénicas de *Vibrio parahaemolyticus*. Según Dileep (2003) (28), una pequeña porción de las cepas ambientales de *Vibrio parahaemolyticus* son virulentas y sólo 1-2% de éstas exhiben una hemólisis tipo β .

Las bacterias marinas tienen diferentes requisitos nutricionales como la necesidad de nutrientes y metales, especialmente el hierro (46). En ambientes marinos, donde se encuentra *Vibrio parahaemolyticus*, el hierro está presente pero en su estado más oxidado, por lo que no puede ser utilizado por las bacterias (43). La limitación del hierro en ecosistemas marinos causa que muchos microorganismos como los vibrios estén obligados a sintetizar sideróforos. Los sideróforos son agentes quelantes fuertes de bajo peso molecular que atrapan el hierro en su estado más oxidado. Utilizando este complejo (sideróforo-hierro) el metal se hace disponible para el microorganismo a través de las proteínas receptoras específicas de la membrana (66). Según el estudio de Boneta en el año 2001 (8), *Vibrio parahaemolyticus* crece más eficientemente en medios que posean altas concentraciones de hierro, mientras que a bajas concentraciones del metal (0.2 μ M) el crecimiento de la bacteria se asocia con la producción de sideróforos. En medios de cultivos sin hierro la bacteria crece pero de forma limitada debido a que no alcanza la fase logarítmica.

A pesar de la distribución mundial de *Vibrio parahaemolyticus* la densidad de éste varía en el ambiente y los mariscos de acuerdo a la temporada del año, la localización en la columna de agua, el tipo de muestra, la contaminación fecal y los métodos analíticos

de aislamiento (27). Al igual que *Vibrio cholerae* y *Vibrio vulnificus* la incidencia de *Vibrio parahaemolyticus* es menor en los meses de invierno en comparación con los de verano (46). Colwell y colaboradores (1985) (21), sugieren que estos microorganismos se encuentran presentes en las muestras pero en estado viable no cultivable (VBNC). El estado VBNC es una respuesta de sobrevivencia de las bacterias asporógenas a condiciones de estrés tales como bajas temperaturas y pocos nutrientes (65). En términos de distribución, la literatura sugiere que la concentración de *Vibrio parahaemolyticus* está limitada en el océano (39). Posiblemente esto se relacione con la temperatura del océano debido a que ésta es baja (en relación a la reportada en las aguas costeras), el hábitat es altamente salino y posee pocos nutrientes (27). Se ha tratado de establecer correlación entre la densidad de *Vibrio parahaemolyticus* y la contaminación fecal (coliformes) pero sin éxito. Según Joseph y otros (1983) (36), varios investigadores reportaron altas concentraciones de *Vibrio parahaemolyticus* en aguas contaminadas vs. las no contaminadas, pero estudios como el de Kaneko y Colwell (1973) (40) en la bahía de Chesapeake en Washington, no encontraron correlación significativa entre los niveles de este organismo y los coliformes. Otro factor a considerar es que la detección de cepas patógenas de *Vibrio parahaemolyticus* en muestras de agua y ostiones puede ser subestimada debido a la ineficiencia de los métodos de detección desarrollados (53).

Otra de las especies de *Vibrio* reconocida como patógeno y que ha acaparado la atención de muchos científicos es *Vibrio vulnificus*. En el pasado se creía que esta bacteria era una cepa de *Vibrio parahaemolyticus* debido a la similitud fenotípica que existe entre ellas (36, 56). Según Cook y colaboradores (2002) (22), *Vibrio vulnificus* es

una bacteria cuyas infecciones presentan un alto índice de mortalidad en los Estados Unidos. Normalmente las infecciones con *Vibrio vulnificus* tienen como principal síndrome clínico septicemia, pero al igual que *Vibrio parahaemolyticus* es capaz de causar gastroenteritis e infecciones en heridas (12). En individuos saludables la gastroenteritis ocurre en un período de 16 horas luego de la ingesta del organismo mientras que el desarrollo de la septicemia ocurre al cabo de 24 (tiempo que le toma a la bacteria en penetrar el torrente sanguíneo) (36). Sin embargo, el tiempo de incubación en infecciones cutáneas puede tardar hasta 36 horas en lo que aparecen los primeros síntomas (sepsis y pústulas con líquido). La dosis infecciosa de *Vibrio vulnificus* en personas saludables es desconocida pero personas con desórdenes crónicos como diabetes, cirrosis, leucemia, sida y asma (que utilizan esteroides como medicamentos) pueden contagiarse con menos de 100 células (12). El consumir un sólo ostión crudo podría ser letal (65). El índice de mortalidad para una persona con septicemia causada por *Vibrio vulnificus* es mayor del 50% mientras que en infecciones en heridas es de 25% (19). Al igual que *Vibrio parahaemolyticus* la mayoría de los casos reportados con *Vibrio vulnificus* ocurren en los meses de verano (48) debido a que a este patógeno le favorecen las temperaturas altas. La literatura sugiere que *Vibrio vulnificus* es potencialmente más invasivo que *Vibrio parahaemolyticus* dada la resistencia que presenta éste a los compuestos antibacteriales naturales presentes en el plasma humano (36).

A *Vibrio vulnificus* se le identificó como patógeno en 1979 y desde entonces se le reconoce como el agente etiológico de varios brotes en los Estados Unidos especialmente

en Florida y Los Ángeles. Un reporte de brotes en la Florida entre los años 1981 hasta 1992, incluyó 2 personas muertas y 237 diagnosticadas con gastroenteritis (causada por vibrios), de las cuales 102 desarrollaron septicemia. El 49% de los casos reportados con septicemia fueron fatales (15) y el 80% de esas muertes las causó *Vibrio vulnificus*. De los casos reportados con gastroenteritis se le atribuyen el 29% a *Vibrio parahaemolyticus* y un 12% a *Vibrio mimicus*. Para el año 1996, *Vibrio vulnificus* causó 16 infecciones donde tres personas perdieron la vida en Los Ángeles. Las víctimas murieron al ingerir ostiones crudos procedentes de la bahía Galveston (dos casos) ubicada en Texas y de la Bahía Eloi en Louisiana (un caso) (14).

Vibrio vulnificus posee varios factores de virulencia para invadir a su hospedero entre los que se encuentran la producción de endotoxinas (58, 63), la TDH (19), los sideróforos y la cápsula, que previene la fagocitosis y la activación del complemento (18). El vector de transmisión común de este patógeno es el ostión. Estudios realizados en Estados Unidos han confirmado más de 150 cepas distintas de *Vibrio vulnificus* en un sólo ostión, en un segundo ostión se encontraron 100 y en un tercero, 50 sugiriendo que existe diversidad en la población de esta bacteria (65). En la actualidad, se reconoce la presencia de *Vibrio vulnificus* alrededor del mundo donde se han reportado casos de éste en diversos países tales como Estados Unidos, Dinamarca, Hong Kong, Japón, África y varias ciudades de América del Sur (58).

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 biorremediación de las aguas residuales.

Como consecuencia se impacta el ambiente marino y por ende, la calidad microbiológica de los bivalvos. Los ostiones y las almejas se han identificado como vectores potenciales de patógenos entéricos tanto virales como bacterianos (9). Entre estos patógenos figuran miembros de la familia Enterobacteriaceae. Las especies que comprenden este grupo son bacilos Gram negativo, asporógenos y anaeróbicos facultativos cuyo reservorio principal es el tracto gastrointestinal de animales de sangre caliente. Algunos de los miembros que forman parte de esta familia y actualmente están reconocidos como patógenos son *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia* spp. y *Escherichia coli* (EHEC, EIEC, EAEC, ETEC y EPEC). En 1887 se determinó la ubicuidad de *Escherichia coli* en las heces fecales de origen humano. Desde el estudio de Sharding (1892), se ha utilizado a *Escherichia coli* como indicador de contaminación fecal y su presencia se relaciona con la de patógenos entéricos en agua o alimentos (13). El desarrollo de una metodología específica para aislar *Escherichia coli* fue complicada debido a que existen bacterias como *Citrobacter* spp., *Klebsiella* spp. y *Enterobacter* spp. que poseen características fenotípicas y bioquímicas similares a ésta, que no se pueden distinguir fácilmente. En consecuencia, se introdujo el término coliformes para describir este grupo de bacterias entéricas.

En la actualidad las agencias gubernamentales y las industrias utilizan los coliformes como indicadores sanitarios de calidad del agua, alimentos o del procesamiento. En el caso de la NSSP, ésta clasifica las zonas para la extracción de bivalvos como abierta o cerrada basado en el análisis de coliformes fecales, mediante el uso de la técnica del Número Más Probable (NMP). El NMP es un método estadístico

utilizado para estimar el número de microorganismos presentes en muestras que posean baja carga microbiana. Éste es basado en tres fases la presuntiva, la confirmativa y la completada (13).

Salmonella es uno de los patógenos más temidos en alimentos dada su virulencia y habilidad para sobrevivir a condiciones de estrés. Ésta bacteria es una de las más importante a nivel mundial por el amplio número de casos de salmonelosis que ocasiona cada año. Generalmente, *Salmonella* se vincula con alimentos crudos, especialmente aquellos de origen animal, los cuales son el vehículo principal de transmisión de la salmonelosis. Investigaciones como la de Roszak y otros (1984) (61), evidencian la presencia de *Salmonella* en ambientes marinos, donde ésta ha sobrevivido por más de cuatro semanas. Según Martínez y colaboradores (2003) (47), la presencia de *Salmonella* en sistemas acuáticos se atribuye a las descargas de aguas residuales urbanas, agrícolas y de aguas residuales en zonas costeras, las cuales representan un foco de contaminación permanente. Además, eventos climáticos como lluvias y tormentas generan escorrentías que transportan bacterias entéricas desde su reservorio hasta la costa contaminando los organismos que crecen ahí. Debido a que los bivalvos habitan en la costa y se alimentan por filtración éstos son capaces de concentrar patógenos como *Salmonella*. En un estudio realizado en Florida, se concluyó que aproximadamente el 20% de los ostiones, las almejas y los cangrejos están contaminados con *Salmonella* y que ésta sobrevive durante todas las temporadas del año (35). Anualmente se reportan en el CDC cientos de casos de salmonelosis donde la fuente principal de contaminación mayormente son frutas, productos lácteos y huevos, aunque también se le ha vinculado al consumo de bivalvos.

Desde el 1978 hasta el 1987 se reportaron en el CDC 80 casos de *Salmonella* (no tifoidal) donde el vehículo de transmisión fueron bivalvos (34). Datos recientes indican sólo un brote de salmonelosis (reportado en el CDC) atribuido a la ingesta de bivalvos entre el período de 1993 al 1998, lo que representa un riesgo menor en comparación con los generados por las especies de *Vibrio* y los virus (47).

Materiales y Métodos

I. Recolección de la muestra

Para clasificar las áreas de donde se extraen bivalvos de la zona suroeste de Puerto Rico se llevaron a cabo análisis bacteriológicos de los bivalvos y del agua. Además, se realizaron medidas de pH, temperatura, oxígeno disuelto (Aquatic Ecosystem Inc.) y salinidad (Hand Held Salinity Refractometer, Fisher Scientific). Se tomaron en consideración los efectos de fenómenos meteorológicos y geográficos del área de cosecha sobre el crecimiento microbiano. Los bivalvos se obtuvieron de dos puntos de la zona suroeste de Puerto Rico (Lajas y Boquerón en Cabo Rojo) (Apéndice 2) mediante un muestreo aleatorio. El período de muestreo fue de doce meses (julio de 2003 a junio 2004). Para evitar contaminación cruzada durante el manejo de muestras, las de Lajas fueron recolectadas durante las primeras dos semanas de cada mes y las de Boquerón se analizaron durante las dos semanas siguientes. Se escogieron dos docenas del bivalvo bajo estudio y se transportaron al laboratorio de microbiología en neveras portátiles con “cold packs” cubiertos con plástico para evitar el contacto directo de las muestras con el hielo. Se utilizaron los métodos oficiales descritos en el “Bacteriological Analytical Manual” (BAM por su siglas en inglés), 8va Edición (Revisión A) para el análisis de los patógenos (13).

II. Procesamiento de la muestra

Los ostiones y las almejas se procesaron en un período menor de tres horas luego de ser recolectados. Se limpiaron según las recomendaciones de la “American Public Health Association” (APHA por sus siglas en inglés) (2, 3), utilizando un cepillo y agua

estéril para remover cualquier contaminante de las valvas, se enjuagaron y se dejaron secar al aire. Se procedió a abrir los ostiones y las almejas bajo condiciones asépticas. Se extrajo la carne y sus líquidos según lo establecido para cada análisis bacteriológico en específico.

III. Análisis bacteriológico de la carne y el licor

La muestra se dividió en tres porciones, 50 g para el análisis de *Vibrio* spp., 25 g para *Salmonella* y 25 g para recuentos totales de bacterias y coliformes fecales. El aislamiento e identificación de estas bacterias se realizó mediante los métodos establecidos en el BAM (13) y por los métodos oficiales de la APHA (2, 3). La identificación de las bacterias aisladas por el método de *Salmonella* spp. y *Escherichia coli* fue realizada por el sistema de pruebas bioquímicas API 20E (Biomerüx, Francia).

IV. Aislamiento de *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus*

Para la identificación de vibrios se utilizó el método establecido en el BAM. Asépticamente se homogenizaron 50 g de la muestra y se mezclaron con 450 ml de agua alcalina peptonada (amortiguador) con 3% de cloruro de sodio (Fisher Scientific), pH 8.5. Se realizaron diluciones en serie en botellas con 90 ml de agua peptonada alcalina con 3% NaCl, añadiendo 10 ml de la botella anterior para lograr un volumen final de 100 ml. Las diluciones se realizaron hasta 10^5 . Se realizó la técnica del Número Más Probable (NMP) en sistema de tres tubos en agua alcalina peptonada e incubando a 35°C por 24 horas.

Al cabo del período de incubación, los tubos positivos se estriaron en platos de agar selectivo y diferencial (TCBS, Difco) compuesto de tiosulfato, citrato, sales biliares y sacarosa, donde *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus* exhiben colonias verdes o azul verdosas de 2 a 3 mm de diámetro. Estos platos se incubaron por 18 horas a 35°C. Las colonias típicas de interés se transfirieron a agar inclinado de soya triptica (TSA, Difco) con 3% de cloruro de sodio. Luego de ser incubados a 35°C por 18 horas, se realizó la tinción Gram y la prueba de oxidasa a estos cultivos. *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus* son bacilos cortos, Gram negativo, en ocasiones curvados y positivos a la prueba de oxidasa, característica principal que distingue a la familia Vibrionaceae de la Enterobacteriaceae.

Se realizó una transferencia de los cultivos que corresponden a la descripción anterior a tubos de caldo de soya triptica (TSB, Difco) con 3% de cloruro de sodio. Luego de incubados a 35 °C por 18 horas, éstos se utilizaron como inóculo para determinar el patrón de tolerancia a sal. Se inocularon tubos conteniendo el caldo de 1% triptona (Difco) y sal (T₁N_x) con concentraciones de cloruro de sodio de 0%, 3%, 6%, 8% y 10%. Éstos se incubaron a 35°C por 18 horas y se comparó el patrón de crecimiento obtenido con el descrito para las especies de *Vibrio* con el propósito de descartar las que no correspondieran a las especies de interés. *Vibrio parahaemolyticus* crece en concentraciones de sal de 3%, 6% y 8% únicamente. *Vibrio vulnificus* crece a concentraciones de sal de 3% y 6% exclusivamente.

Para corroborar la identidad de los vibrios sospechosos se realizaron pruebas bioquímicas. Éstas fueron la prueba de fermentación de arabinosa con 3% cloruro de

sodio, el crecimiento en agar de tres azúcares y hierro con 3% cloruro de sodio (TSI con 3% NaCl, Difco) y la hidrólisis de urea con 3% de cloruro de sodio. *Vibrio parahaemolyticus* fermenta arabinosa, produce un fondo ácido y una superficie alcalina en TSI y generalmente es negativo a la hidrólisis de urea. *Vibrio vulnificus* no fermenta arabinosa, usualmente produce una superficie alcalina en TSI y normalmente presenta resultados variables en la prueba de hidrólisis de urea. Los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas y de halofilismo realizadas a los sospechosos se corroboraron con el comportamiento de las cepas controles *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802 y *Vibrio vulnificus* ATCC 27562.

V. Aislamiento de coliformes fecales

Para la aislación de las coliformes se utilizó el método establecido en el BAM. Asépticamente se recolectaron 25 g del bivalvo incluyendo el líquido de éste y se homogenizaron en 225 ml de amortiguador salino fosfatado (PBS). Se realizaron diluciones en serie en botellas con 90 ml de PBS, añadiendo 10 ml de la botella anterior para lograr un volumen final de 100 ml. Las diluciones se realizaron hasta 10^5 . Se realizó la técnica del Número Más Probable (NMP) en sistema de tres tubos en caldo de triptosa con sulfato láurico (Difco) y se incubaron a 35 °C por 24 horas. Tubos con resultados positivos (con presencia de turbidez y gas) se transfirieron a caldo para *Escherichia coli* (EC broth) (Difco) y se incubó a 44.5 °C en un baño para coliformes (GCA Corporation, Modelo Presicion) por 24 horas. Resultados positivos para el caldo EC se reportaron como NMP/g de coliformes fecales. Éstos se sembraron en medio sólido con azul de metileno y eosina (L-EMB) donde se incubaron a 35 °C por 24 horas. Este medio es

selectivo y diferencial para *Escherichia coli* donde colonias típicas se observan de color verde metálico. Las colonias de interés se sembraron en caldo lactosado (Difco) por un período de 24 horas a 35 °C. Finalmente se realizó una tinción Gram para hacer un análisis microscópico y corroborar que los aislados eran bacilos de color rosado (Gram negativo). La identidad de las bacterias aisladas se verificó con el sistema de API 20E. Los resultados obtenidos en cada paso se compararon con el comportamiento de la cepa control de *Escherichia coli* ATCC14763.

Todas las bacterias aisladas por la metodología de coliformes fecales y *Salmonella* que fueron identificadas como *Escherichia coli* por el sistema API 20E se sometieron a un método rápido de identificación para *Escherichia coli* O157:H7. El método utilizado fue el sistema BAX[®] (Dupont, Qualicon).

VI. Procedimiento para el aislamiento de especies de *Salmonella*

Para la aislación de especies de *Salmonella* se utilizó el método establecido en el BAM. Asépticamente se recolectaron 25 g del bivalvo incluyendo el líquido interno de éste y se homogenizaron en 225 ml de caldo lactosado (Difco). El homogenado se dejó reposar por una hora a temperatura ambiente. Al concluir este tiempo se realizaron diluciones en serie en botellas con 90 ml de PBS, añadiendo 10 ml de la botella anterior para lograr un volumen final de 100 ml. Las diluciones se realizaron hasta 10^5 y se incubaron por 24 horas a 35 °C. Ésto se realizó como paso de enriquecimiento. De las diluciones que mostraron turbidez, se sembró en caldo de Rappaport-Vassiliadis (RV, Difco) y caldo de tetraciónato (TT, Difco). El RV se incubó a 42° C y el

TT a 43 °C en un baño de agua (GCA Corporation, Modelo Presicion) por 24 horas. Finalizado el período de incubación, tubos que presentaron turbidez se estriaron en agar de xilosa lisina desoxicolato (XLD), agar entérico Hektoen (HE) y agar de sulfito bismutado (BS). Estos platos se incubaron a 35 °C por 24 horas. Colonias típicas de *Salmonella* en XLD se observan de color rosa, en HE son azul-verdosas y en BS crecen verdes, gris o negras en ocasiones con brillo metálico. En cualquiera de estos medios diferenciales las colonias pueden presentarse con o sin centro negro (producción de H₂S). Las colonias de interés se sembraron en agar nutriente (Difco) y se incubaron a 35 °C por 24 horas. Al cabo de este tiempo de incubación se realizó la tinción Gram y se sometió a análisis microscópico. *Salmonella* se observa como un bacilo corto Gram negativo. Los aislados que mostraron las características microscópicas de interés se transfirieron a agar inclinado de lisina con hierro (LIA) y agar de tres azúcares (TSIA) (Difco). Estos tubos se incubaron a 35 °C por 24 horas. *Salmonella* en LIA y TSIA típicamente produce reacción alcalina con o sin producción de H₂S. Tubos con patrones clásicos de *Salmonella* se corroboró su identidad con el sistema de API 20E. Los resultados obtenidos en cada paso se compararon con el comportamiento de la cepa control de *Salmonella* ATCC 13311.

VII. Recuento total aeróbico en platos

Para el recuento total aeróbico se siguió el procedimiento establecido en el BAM. Se utilizaron las diluciones seriadas preparadas en la enumeración de las coliformes para realizar el recuento total aeróbico. En duplicado se vertió 1 ml de cada dilución en platos al cual se le añadió medio para recuento en plato (PCA) (Difco). Se mezcló el

líquido y se dejó enfriar hasta que el medio estuviera sólido. Estos platos se incubaron a 35 °C por 24 horas. Luego de este período de incubación utilizando un contador de colonias (Fisher Scientific) se enumeró el crecimiento de bacterias. Sólo se reportaron las densidades de platos que poseían entre 25-250 colonias.

VIII. Análisis bacteriológico del agua de extracción de bivalvos

Del área donde se extrajo los bivalvos se colectaron 500 ml de agua utilizando la metodología de la APHA (3) y se colocaron en “Whirl Pak[®]” estériles. La muestra de agua se dividió en tres porciones y se sometieron al mismo análisis bacteriológico que las muestras de bivalvos.

IX. Análisis estadístico

Se realizaron pruebas bioquímicas a todos los aislados y se compararon con el perfil establecido en el BAM (13) para lograr identificar con género y especie todas las bacterias. Según los resultados obtenidos por la técnica del NMP se calculó el número de organismos presentes en los tubos que contenían *Vibrio* spp. y coliformes fecales (*Escherichia coli*). Para esto se usaron las tablas correspondientes de NMP ubicadas en el Apéndice 2 del BAM (13). Se graficó el logaritmo de la densidad de *Vibrio* spp. y coliformes fecales (*Escherichia coli*) por gramo de bivalvo o ml de agua versus el tiempo (mes).

Para establecer si existía correlación entre la densidad de *Vibrio* spp. y las variantes físico-químicas como la salinidad, el pH, la concentración de oxígeno disuelto y

la temperatura se realizó un análisis de correlación (“Spearman correlation”). Este método examina el grado de asociación existente entre dos variables independientes (45). Se realizó el análisis de correlación a través del empleo del programa estadístico llamado Infostat[®] (versión 3.02). Se consideró significativa la correlación entre la densidad de vibrios y los parámetros físico-químicos si el Error Tipo I (α) era menor de 0.05. Las hipótesis de interés en este análisis estadístico son la nula (H_0) y la alterna (H_a). En este estudio se establecieron de la siguiente manera:

H_0 : No hay correlación entre el promedio de la densidad de vibrios con las variables físico-químicas como la salinidad, el pH, la temperatura y la concentración de oxígeno disuelto.

H_a : Existe correlación entre el promedio de la densidad de vibrios con las variables físico-químicas como la salinidad, el pH, la temperatura y la concentración de oxígeno disuelto.

Resultados

I. Densidad de vibrios en bivalvos y en las aguas de extracción de la zona suroeste de Puerto Rico

Se determinó la densidad de *Vibrio* spp. en ostiones, almejas y las aguas de extracción de bivalvos de Boquerón y Lajas a través del método del NMP (Apéndice 3, 4, 5 y 6). En todas las muestras analizadas se observó diversidad de valores que fluctuaban entre < 0.48 hasta $5.04 \log_{10}$ ufc de vibrios g^{-1} de bivalvo o ml^{-1} de agua. Los resultados obtenidos se encuentran en la Tabla 1, 2 y Figura 1, 2. Se observó que los ostiones, las almejas y las aguas de extracción tienen en promedio la menor densidad de vibrios en el período de octubre a enero (Figura 1 y 2).

Se examinaron los datos obtenidos en términos de normalidad para establecer si éstos tenían una distribución normal (curva en forma de campana). Debido a que no se presentó esta tendencia fue necesario realizar pruebas estadísticas no paramétricas como la correlación de Spearman. Esta prueba demostró que no existe correlación entre el promedio de la densidad de vibrios con las variables físico-químicas como la salinidad, el pH, la temperatura y la concentración de oxígeno disuelto en los lugares monitoreados (Apéndice 13).

La familia Vibrionaceae está compuesta por varias especies que difieren en características bioquímicas, tolerancia a diferentes concentraciones de sal y crecimiento en medios de cultivos diferenciales como TCBS. Basado en esto se identificaron las bacterias aisladas a través de la metodología de *Vibrio* establecida en el BAM (13). Se aislaron varias especies de vibrios y se calculó su abundancia relativa en las muestras

(Tabla 3)^A. *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio mimicus* fueron identificadas en todas las muestras analizadas. Mientras que *Vibrio cholerae* se identificó en todas las muestras, excepto en el agua de extracción de ostiones de Lajas. Por el contrario *Vibrio vulnificus* sólo se identificó en los ostiones de Boquerón.

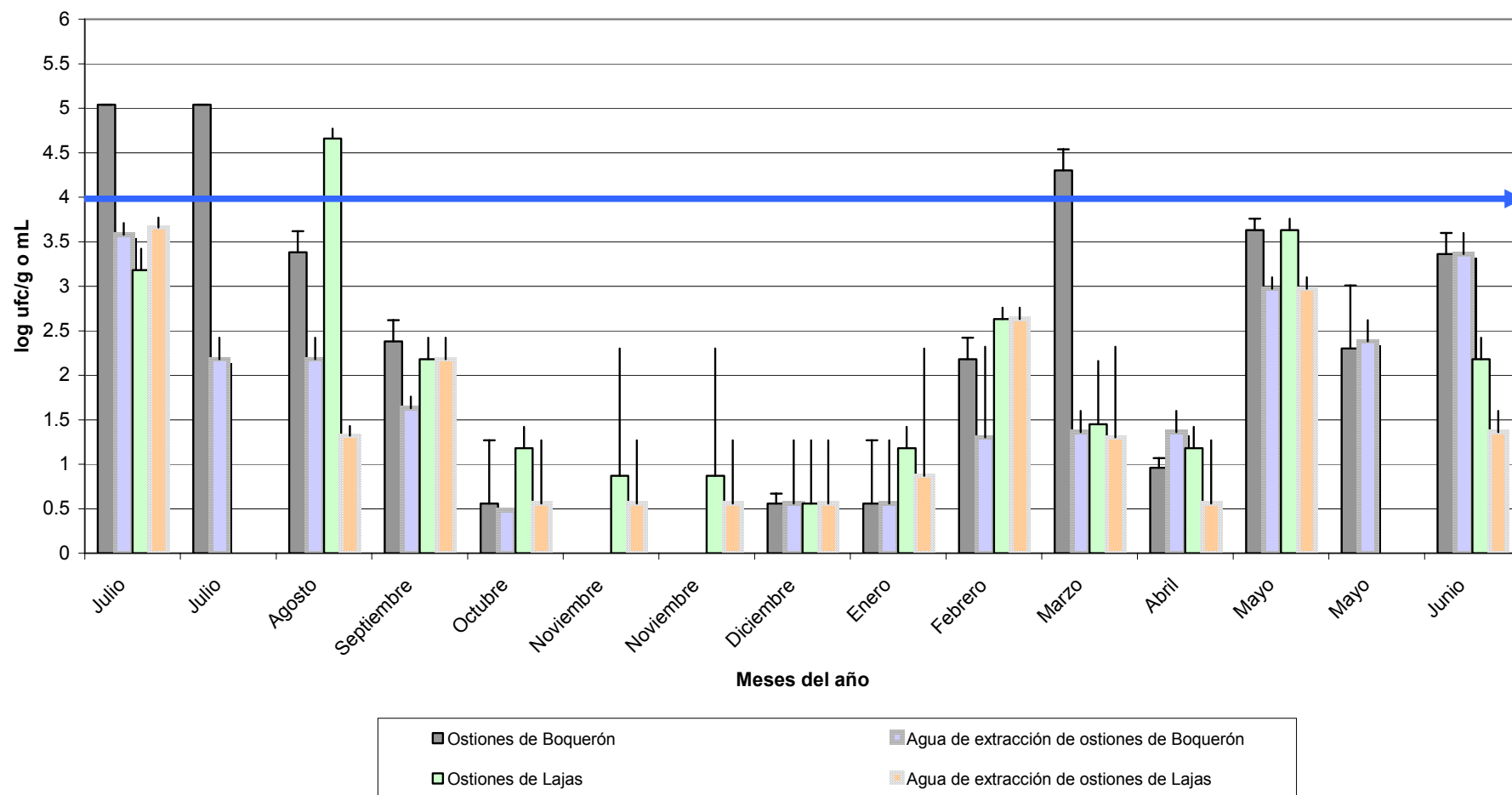
Tabla 1. Densidad de vibrios en ostiones (*Crassostrea rhizophorae*) y en las aguas de extracción del suroeste de Puerto Rico durante el período de julio de 2003 a junio de 2004

Mes	Ostiones de Boquerón (log ₁₀ ufc g ⁻¹)	Zona de extracción de Boquerón (log ₁₀ ufc ml ⁻¹)	Ostiones de Lajas (log ₁₀ ufc g ⁻¹)	Zona de extracción de Lajas (log ₁₀ ufc ml ⁻¹)
Julio	5.04	3.58	3.18	3.66
Julio *	5.04	2.18	ND	ND
Agosto	3.38	2.18	4.66	1.32
Septiembre	2.38	1.63	2.18	2.18
Octubre	0.56	0.48	1.18	0.56
Noviembre *	ND	ND	0.87	0.56
Noviembre *	ND	ND	0.87	0.56
Diciembre *	0.56	0.56	0.56	0.56
Enero	0.56	0.56	1.18	0.87
Febrero	2.18	1.30	2.63	2.63
Marzo	4.30	1.36	1.45	1.30
Abril	0.96	1.36	1.18	0.56
Mayo	3.63	2.97	3.63	2.97
Mayo	2.30	2.38	ND	ND
Junio	3.36	3.36	2.18	1.36

*ND (No determinado) Indica que no se realizó muestreo debido a las inclemencias del tiempo.

^A La abundancia relativa de estos microorganismos se calculó a base del número total de tubos que contenían especies recuperadas por el protocolo de *Vibrio*, segregados por zona y tipo de muestra.

Figura 1. Densidad de vibrios en ostiones (*Crassostrea rhizophorae*) y en las aguas de extracción del suroeste de Puerto Rico durante el período de julio de 2003 a junio de 2004.



→ Límite sugerido por la NSSP ($4.00 \log_{10} \text{ ufc g}^{-1}$ de ostión)

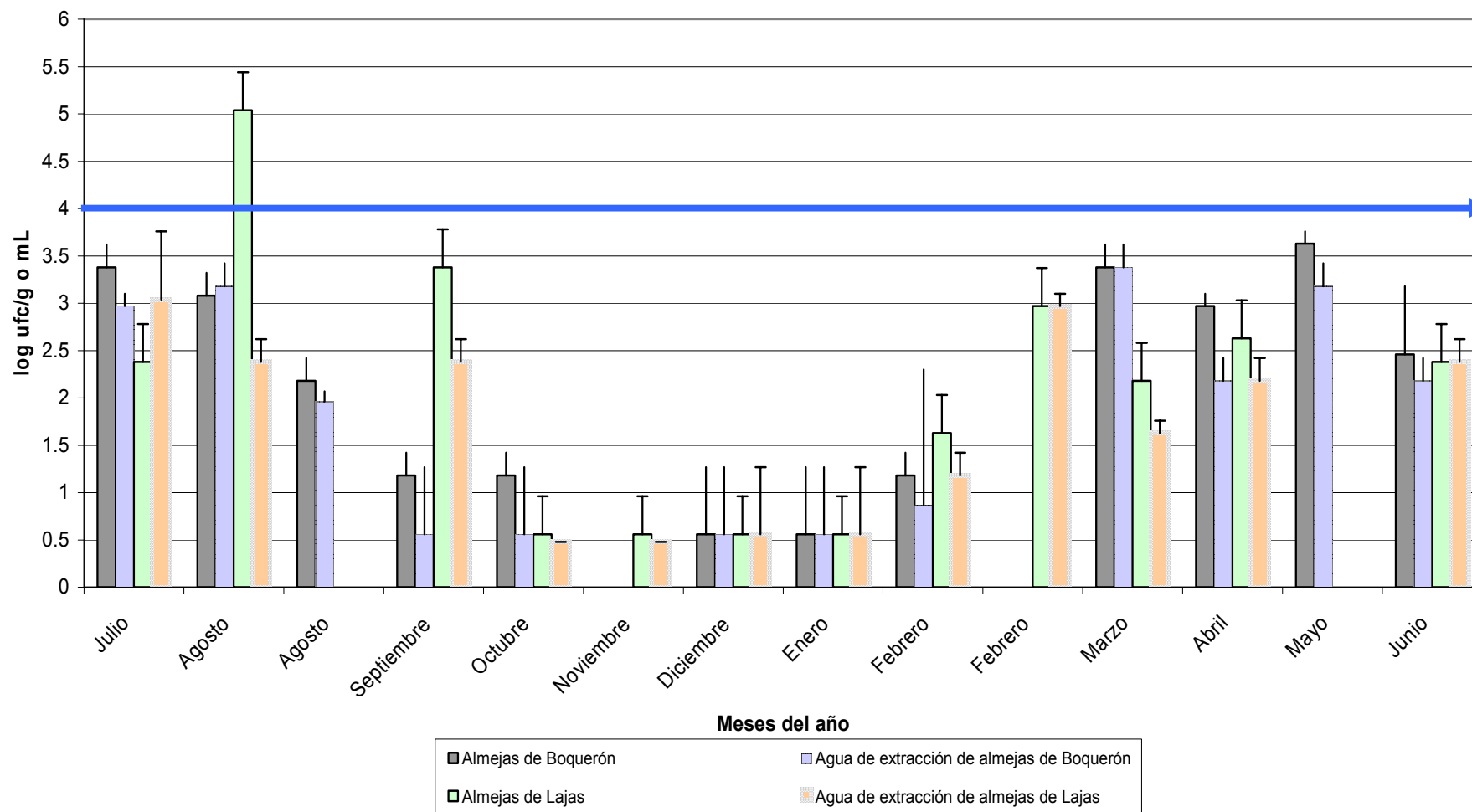
— Representa el error estándar

Tabla 2. Densidad de vibrios en almejas (*Lucina pectinata*) y en las aguas de extracción del suroeste de Puerto Rico durante el período de julio de 2003 a junio de 2004

Mes	Almejas de Boquerón (log ₁₀ ufc g ⁻¹)	Zona de extracción de Boquerón (log ₁₀ ufc ml ⁻¹)	Almejas de Lajas (log ₁₀ ufc g ⁻¹)	Zona de extracción de Lajas (log ₁₀ ufc ml ⁻¹)
Julio	3.38	2.97	2.38	3.04
Agosto	3.08	3.18	5.04	2.38
Agosto *	2.18	1.96	ND	ND
Septiembre	1.18	0.56	3.38	2.38
Octubre	1.18	0.56	0.56	0.48
Noviembre*	ND	ND	0.56	0.48
Diciembre	0.56	0.56	0.56	0.56
Enero	0.56	0.56	0.56	0.56
Febrero	1.18	0.87	1.63	1.18
Febrero*	ND	ND	2.97	2.97
Marzo	3.38	3.38	2.18	1.63
Abril	2.97	2.18	2.63	2.18
Mayo *	3.63	3.18	ND	ND
Junio	2.46	2.18	2.38	2.38

*ND (No determinado) Indica que no se realizó muestreo debido a las inclemencias del tiempo.

Figura 2. Densidad de vibrios en almejas (*Lucina pectinata*) y en las aguas de extracción del suroeste de Puerto Rico durante el período de julio de 2003 a junio 2004.



→ Límite sugerido por la NSSP (4.00 $\log_{10}$ ufc g^{-1} de almeja)

┴ → Representa el error estándar

Tabla 3. Abundancia relativa de vibrios en bivalvos y en las aguas de extracción de la zona suroeste de Puerto Rico durante el período de julio de 2003 a junio de 2004

Fuente	Nombre de la especie	(%)
Ostiones de Boquerón	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	46
	<i>Vibrio mimicus</i>	23
	<i>Vibrio cholerae</i>	4
	<i>Vibrio vulnificus</i>	8
	Otras especies	19
Agua de extracción de ostiones de Boquerón	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	23
	<i>Vibrio mimicus</i>	15
	<i>Vibrio cholerae</i>	15
	<i>Vibrio vulnificus</i>	---
	Otras especies	47
Ostiones de Lajas	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	31
	<i>Vibrio mimicus</i>	8
	<i>Vibrio cholerae</i>	8
	<i>Vibrio vulnificus</i>	---
	Otras especies	53
Agua de extracción de ostiones de Lajas	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	31
	<i>Vibrio mimicus</i>	15
	<i>Vibrio cholerae</i>	---
	<i>Vibrio vulnificus</i>	---
	Otras especies	54
Almejas de Boquerón	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	33
	<i>Vibrio mimicus</i>	25
	<i>Vibrio cholerae</i>	17
	<i>Vibrio vulnificus</i>	---
	Otras especies	25
Agua de extracción de almejas de Boquerón	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	25
	<i>Vibrio mimicus</i>	8
	<i>Vibrio cholerae</i>	8
	<i>Vibrio vulnificus</i>	---
	Otras especies	59
Almejas de Lajas	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	33
	<i>Vibrio mimicus</i>	8
	<i>Vibrio cholerae</i>	8
	<i>Vibrio vulnificus</i>	---
	Otras especies	51
Agua de extracción de almejas de Lajas	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	17
	<i>Vibrio mimicus</i>	8
	<i>Vibrio cholerae</i>	8
	<i>Vibrio vulnificus</i>	---
	Otras especies	67

II. Densidad de coliformes fecales en bivalvos y las aguas de extracción del suroeste de Puerto Rico

La densidad de coliformes fecales se determinó en ostiones, almejas y las aguas de extracción de bivalvos de Boquerón y Lajas a través del uso de la técnica de NMP (Apéndice 7, 8, 9 y 10). En todas las muestras analizadas se observaron valores que fluctuaron entre < 0.48 hasta $1.97 \log_{10}$ ufc de coliformes fecales g^{-1} de bivalvo o ml^{-1} de agua. Los resultados obtenidos se encuentran en la Tabla 4, 5 y Figura 3, 4. Se observó que los recuentos de coliformes en todas las muestras analizadas se mantuvieron relativamente bajos y constantes (Figura 1 y 2).

Para confirmar si los coliformes aislados eran cepas de *Escherichia coli* se utilizó el sistema de pruebas bioquímicas API 20E. Se identificaron básicamente las mismas especies de coliformes en todas las muestras analizadas. Entre los microorganismos recuperados se encuentran *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella planticola*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas* spp. y *Escherichia coli*.

Todas las bacterias aisladas identificadas como *Escherichia coli* por el sistema API 20E, se sometieron al sistema BAX[®], un método rápido de identificación de *Escherichia coli* O157:H7. Todas las muestras analizadas por BAX[®] fueron negativas para la identificación de *Escherichia coli* O157:H7.

Tabla 4. Densidad de coliformes fecales en ostiones (*Crassostrea rhizophorae*) y en las aguas de extracción del suroeste de Puerto Rico durante el período de julio de 2003 a junio de 2004

Mes	Ostiones de Boquerón (log ₁₀ ufc g ⁻¹)	Zona de extracción de Boquerón (log ₁₀ ufc ml ⁻¹)	Ostiones de Lajas (log ₁₀ ufc g ⁻¹)	Zona de extracción de Lajas (log ₁₀ ufc ml ⁻¹)
Julio	0.48	0.48	0.48	0.48
Julio*	0.48	0.56	ND	ND
Agosto	0.96	0.56	0.48	0.48
Septiembre	0.48	0.48	0.48	0.48
Octubre	0.48	0.48	0.48	0.48
Noviembre*	ND	ND	0.48	0.48
Noviembre*	ND	ND	0.96	0.96
Diciembre	0.48	0.48	1.18	0.56
Enero	0.56	0.56	0.48	0.48
Febrero	0.48	0.48	0.56	0.48
Marzo	0.56	0.96	0.48	0.48
Abril	0.48	1.36	0.48	0.48
Mayo	0.48	0.48	1.63	0.56
Mayo*	0.48	0.48	ND	ND
Junio	0.48	0.48	0.48	0.48

*ND (No determinado) Indica que no se realizó muestreo debido a las inclemencias del tiempo.

Figura 3. Densidad de coliformes fecales en ostiones (*Crassostrea rhizophorae*) y en las aguas de extracción de bivalvos de la zona suroeste de Puerto Rico durante el período de julio de 2003 a junio de 2004.

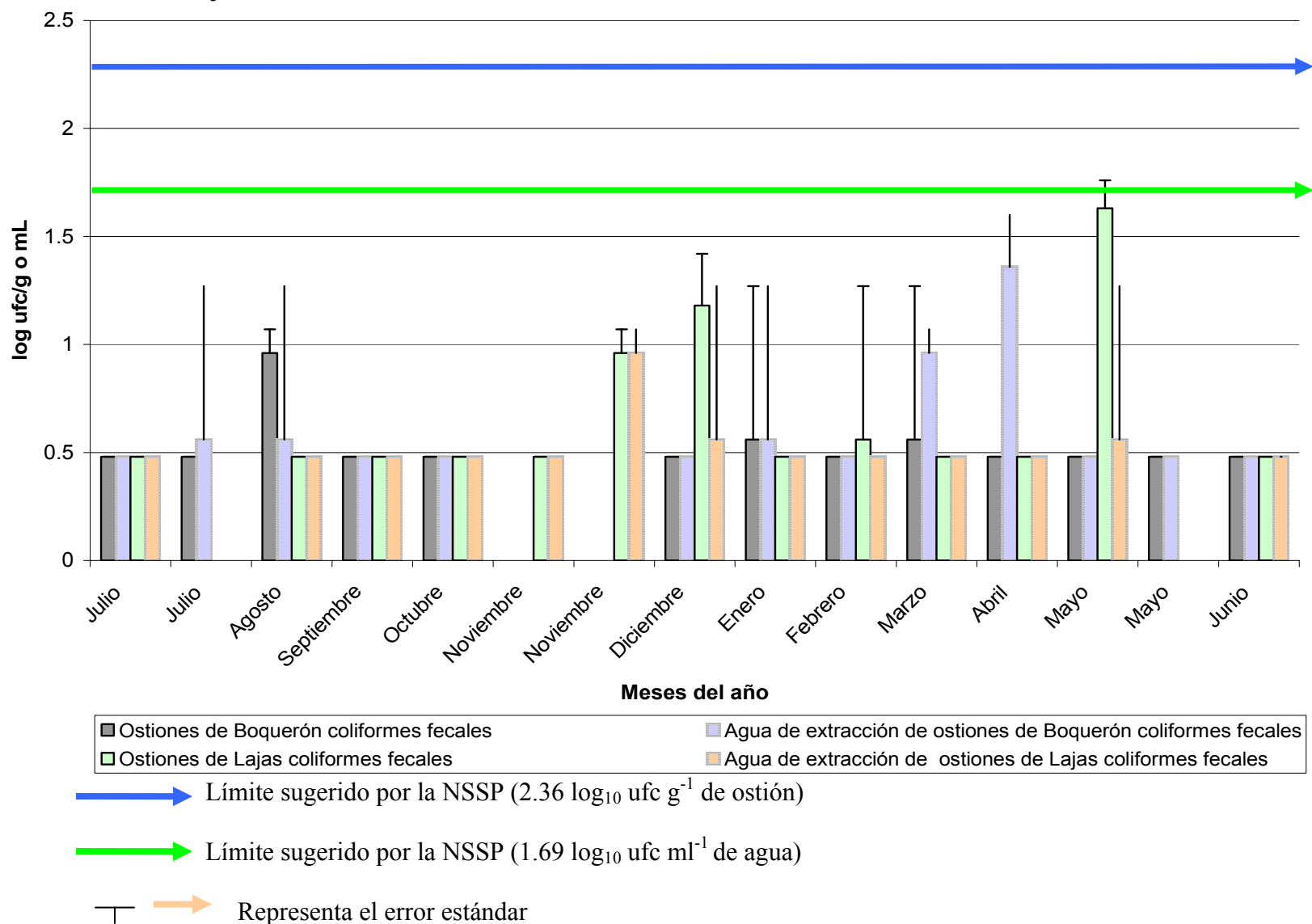
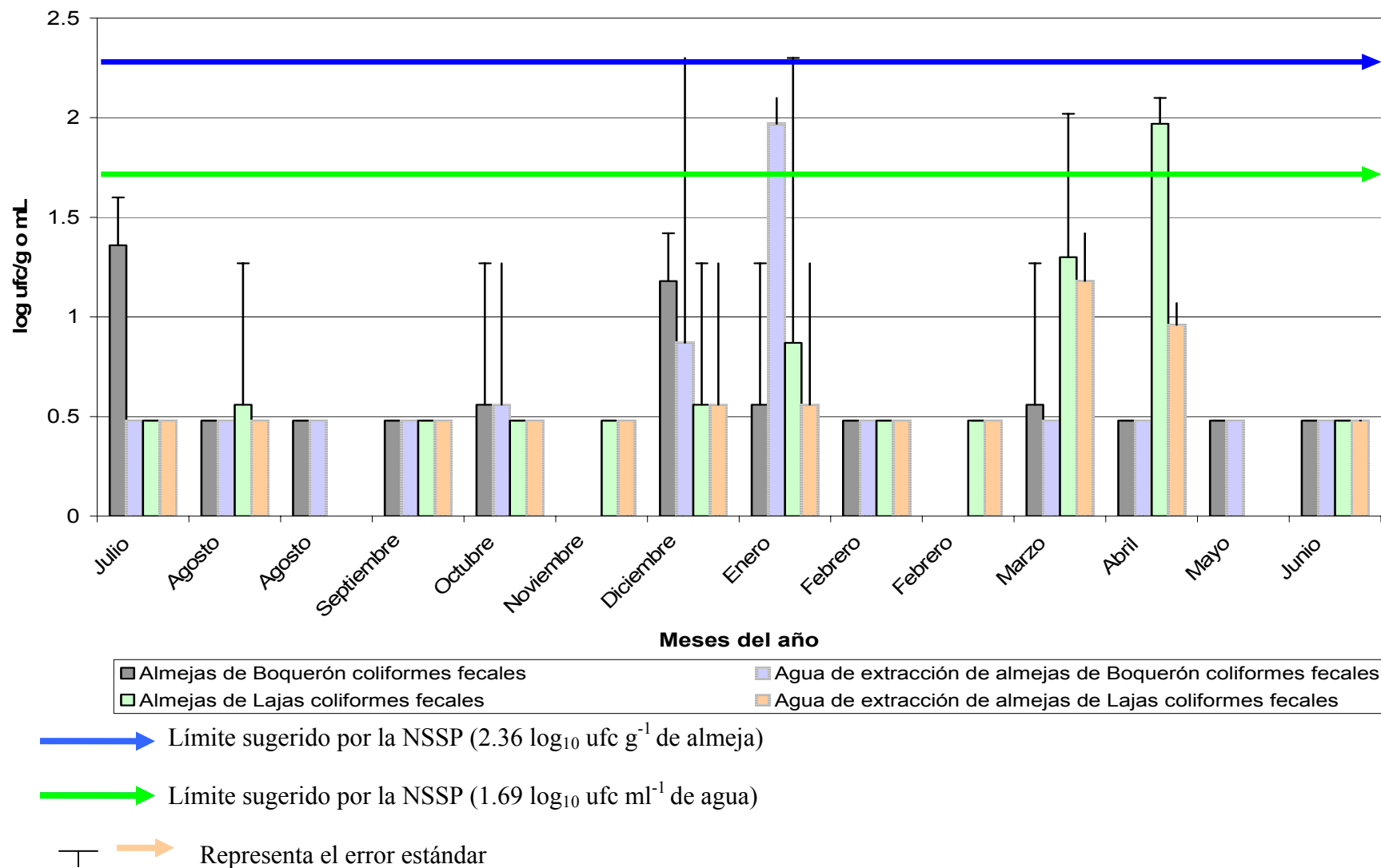


Tabla 5. Densidad de coliformes fecales en almejas (*Lucina pectinata*) y en las aguas de extracción del suroeste de Puerto Rico durante el período de julio de 2003 a junio de 2004

Mes	Almejas de Boquerón (log ₁₀ ufc g ⁻¹)	Zona de extracción de Boquerón (log ₁₀ ufc ml ⁻¹)	Almejas de Lajas (log ₁₀ ufc g ⁻¹)	Zona de extracción de Lajas (log ₁₀ ufc ml ⁻¹)
Julio	1.36	0.48	0.48	0.48
Agosto	0.48	0.48	0.56	0.48
Agosto *	0.48	0.48	ND	ND
Septiembre	0.48	0.48	0.48	0.48
Octubre	0.56	0.56	0.48	0.48
Noviembre *	ND	ND	0.48	0.48
Diciembre	1.18	0.87	0.56	0.56
Enero	0.56	1.97	0.87	0.56
Febrero	0.48	0.48	0.48	0.48
Febrero *	ND	ND	0.48	0.48
Marzo	0.56	0.48	1.30	1.18
Abril	0.48	0.48	1.97	0.96
Mayo *	0.48	0.48	ND	ND
Junio	0.48	0.48	0.48	0.48

*ND (No determinado) Indica que no se realizó muestreo debido a las inclemencias del tiempo.

Figura 4. Densidad de coliformes fecales en almejas (*Lucina pectinata*) y en las aguas de extracción de bivalvos de la zona suroeste de Puerto Rico durante el período de julio de 2003 a junio de 2004.



III. Aislamiento de *Salmonella* en bivalvos y las aguas de extracción del suroeste de Puerto Rico

En ninguna de las muestras analizadas se detectó la presencia de especies de *Salmonella*. Mediante la metodología establecida en el BAM para la aislación de ésta, se recuperaron otras bacterias pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae. Entre ellas especies *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Shigella*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia liquefaciens*, *Proteus mirabilis*, *Morganella morganii* y *Escherichia coli*. Se observó que en todas las muestras estaban presentes las mismas bacterias con la excepción de *Morganella morganii*.

Tabla 6. Microorganismos aislados mediante el protocolo de recuperación de *Salmonella* en bivalvos y en las aguas de extracción de la zona suroeste de Puerto Rico durante el período de julio de 2003 a junio de 2004

Fuente	Microorganismos identificados por el sistema API 20E
Ostiones y las aguas de extracción de Boquerón	<i>Pseudomonas</i> spp., <i>Klebsiella</i> spp., <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Serratia liquefaciens</i> , <i>Citrobacter</i> spp. y <i>Shigella</i> spp.
Ostiones y las aguas de extracción de Lajas	<i>Pseudomonas</i> spp., <i>Klebsiella</i> spp., <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Serratia liquefaciens</i> , <i>Citrobacter</i> spp., <i>Morganella morganii</i> y <i>Shigella</i> spp.
Almejas y las aguas de extracción de Boquerón	<i>Pseudomonas</i> spp., <i>Klebsiella</i> spp., <i>Enterobacter</i> spp., <i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus</i> spp., <i>Serratia liquefaciens</i> , <i>Citrobacter</i> spp. y <i>Shigella</i> spp.
Almejas y las aguas de extracción de Lajas	<i>Pseudomonas</i> spp., <i>Klebsiella</i> spp., <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Serratia liquefaciens</i> , <i>Citrobacter</i> spp. y <i>Shigella</i> spp.

IV. Recuento total aeróbico en bivalvos y en las aguas de extracción del suroeste de Puerto Rico

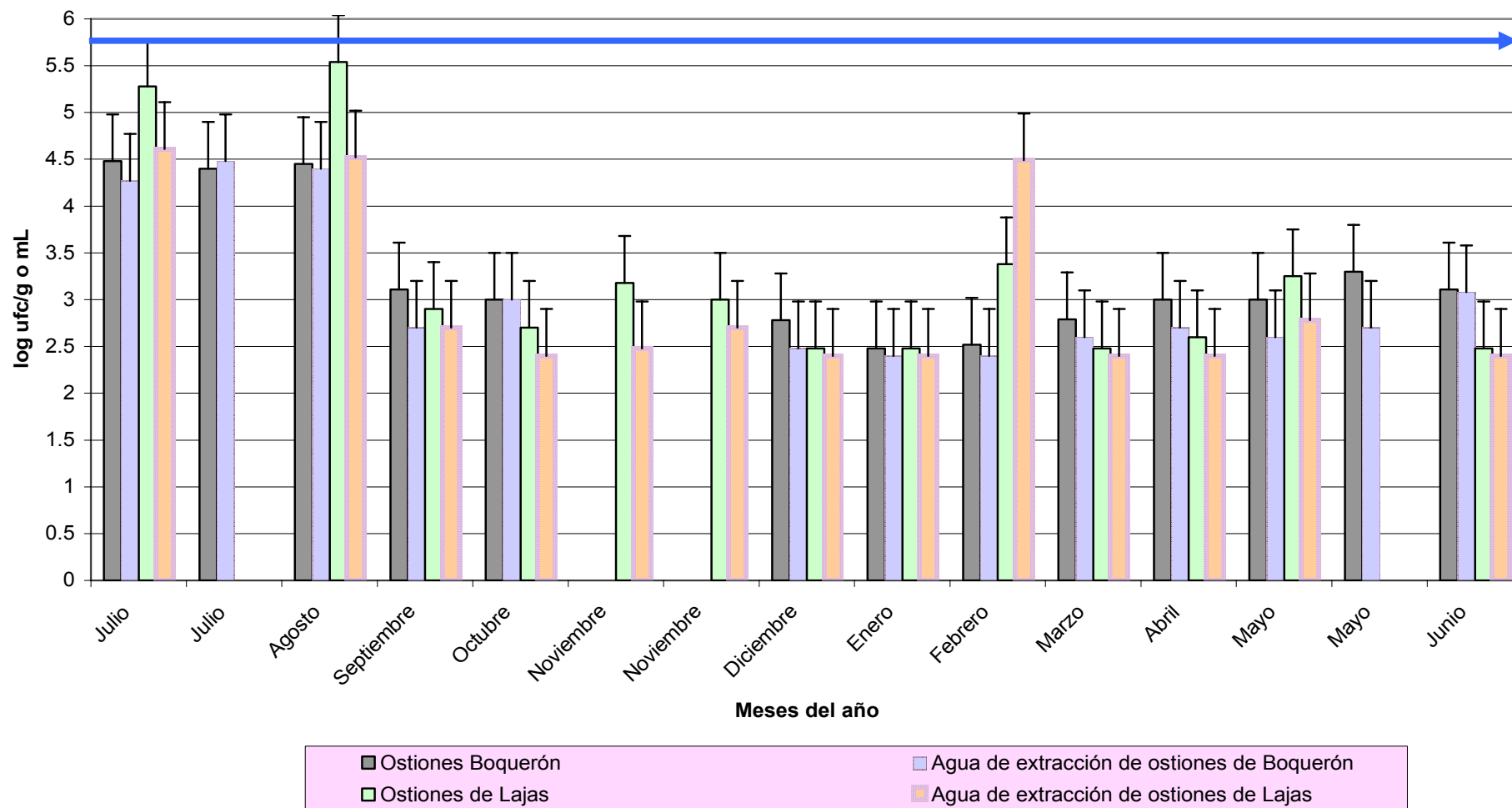
El recuento total aeróbico (PCA) se utiliza para indicar la calidad microbiológica en alimentos. Se realizó el recuento total en placa utilizando el medio de cultivo PCA para determinar la densidad de heterotrófos cultivables. La data recopilada para esta prueba se puede apreciar en la Tabla 7, 8 y Figura 5, 6. Los recuentos totales aeróbicos en las muestras analizadas mostraron valores entre 2.40 hasta 5.61 $\log_{10}$ ufc g^{-1} de bivalvo o ml^{-1} de agua (Apéndice 11 y 12). Los resultados obtenidos en el caso de los ostiones y las zonas de extracción (Tabla 7 y Figura 5) en promedio indican una densidad menor de bacterias heterotróficas en el período de septiembre a enero. Mientras que para las almejas y sus zonas de extracción se observa que los recuentos se mantuvieron relativamente constantes en todas las muestras (Tabla 8 y Figura 6).

Tabla 7. Recuentos totales aeróbicos en ostiones (*Crassostrea rhizophorae*) y en las aguas de extracción del suroeste de Puerto Rico durante el período de julio de 2003 a junio de 2004

Mes	Ostiones de Boquerón (log ₁₀ ufc g ⁻¹)	Zona de extracción de Boquerón (log ₁₀ ufc ml ⁻¹)	Ostiones de Lajas (log ₁₀ ufc g ⁻¹)	Zona de extracción de Lajas (log ₁₀ ufc ml ⁻¹)
Julio	4.48	4.27	5.28	4.61
Julio *	4.40	4.48	ND	ND
Agosto	4.45	4.40	5.54	4.52
Septiembre	3.11	2.70	2.90	2.70
Octubre	3.00	3.00	2.70	2.40
Noviembre *	ND	ND	3.18	2.48
Noviembre *	ND	ND	3.00	2.70
Diciembre	2.78	2.48	2.48	2.40
Enero	2.48	2.40	2.48	2.40
Febrero	2.52	2.40	3.38	4.49
Marzo	2.79	2.60	2.48	2.40
Abril	3.00	2.70	2.60	2.40
Mayo	3.00	2.60	3.25	2.78
Mayo *	3.30	2.70	ND	ND
Junio	3.11	3.08	2.48	2.40

***ND** (No determinado) Indica que no se realizó muestreo debido a las inclemencias del tiempo.

Figura 5. Recuentos totales aeróbicos en ostiones (*Crassostrea rhizophorae*) y en las aguas de extracción del suroeste de Puerto Rico durante el periodo de julio de 2003 a junio de 2004.



→ Límite sugerido por la NSSP (5.70 log₁₀ ufc g⁻¹ de ostiones)

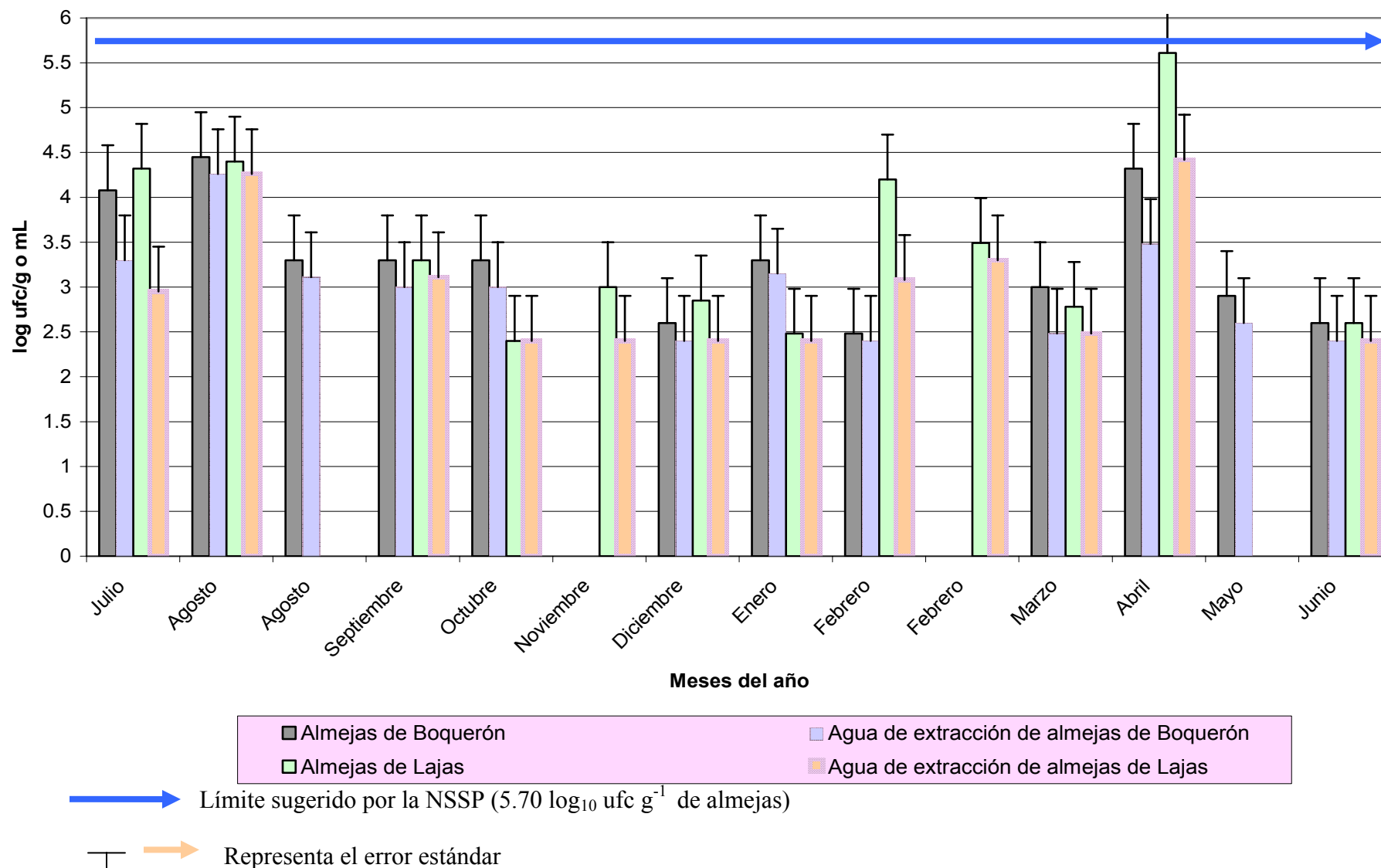
— Representa el error estándar

Tabla 8. Recuentos totales aeróbicos en almejas (*Lucina pectinata*) y en las aguas de extracción del suroeste de Puerto Rico durante el período de julio de 2003 a junio de 2004

Mes	Almejas de Boquerón (log ₁₀ ufc g ⁻¹)	Zona de extracción de Boquerón (log ₁₀ ufc ml ⁻¹)	Almejas de Lajas (log ₁₀ ufc g ⁻¹)	Zona de extracción de Lajas (log ₁₀ ufc ml ⁻¹)
Julio	4.08	3.30	4.32	2.95
Agosto	4.45	4.26	4.40	4.26
Agosto *	3.30	3.11	ND	ND
Septiembre	3.30	3.00	3.30	3.11
Octubre	3.30	3.00	2.40	2.40
Noviembre *	ND	ND	3.00	2.40
Diciembre	2.60	2.40	2.85	2.40
Enero	3.30	3.15	2.48	2.40
Febrero	2.48	2.40	4.20	3.08
Febrero *	ND	ND	3.49	3.30
Marzo	3.00	2.48	2.78	2.48
Abril	4.32	3.48	5.61	4.42
Mayo *	2.90	2.60	ND	ND
Junio	2.60	2.40	2.60	2.40

*ND (No determinado) Indica que no se realizó muestreo debido a las inclemencias del tiempo.

Figura 6. Recuentos totales aeróbicos en almejas (*Lucina pectinata*) y en las aguas de extracción del suroeste de Puerto Rico durante el período de julio de 2003 a junio de 2004.



V. Parámetros físico-químicos de las aguas de extracción de bivalvos de Boquerón y Lajas

Los parámetros físico-químicos son una medida de la calidad del agua que se está monitoreando. En esta investigación se tomaron medidas de cuatro variantes físico-químicas como la concentración de oxígeno disuelto (mg/l), la temperatura (°C), el pH y la salinidad. Estos datos se recolectaron con el propósito de correlacionar la densidad de vibrios con éstos y para obtener una idea general del ambiente donde se cosechan estos bivalvos. Tomando en consideración las medidas de los parámetros físico-químicos obtenidos caracterizamos estos dos lugares como alcalinos y salinos.

Tabla 9. Parámetros físico-químicos en el agua de extracción de ostiones de la zona suroeste de Puerto Rico durante el período de julio de 2003 a junio de 2004

Lugar monitoreado	Mes	Oxígeno disuelto (mg/l)	Temperatura (°C)	pH	Salinidad (‰)
Boquerón	Julio	6.70	27.80	8.23	34.00
Boquerón	Julio	6.80	28.00	8.28	34.00
Lajas	Julio	6.10	27.90	8.33	35.00
Boquerón	Agosto	6.60	27.40	8.34	35.00
Lajas	Agosto	7.20	27.60	8.29	33.00
Boquerón	Septiembre	6.10	27.90	8.33	35.00
Lajas	Septiembre	7.40	26.90	6.45	11.00 ^B
Boquerón	Octubre	7.20	27.60	8.29	33.00
Lajas	Octubre	6.70	28.50	8.25	35.00
Boquerón*	Noviembre	ND	ND	ND	ND
Lajas	Noviembre	6.18	27.40	8.29	34.00
Lajas	Noviembre	6.20	27.20	8.32	35.00
Boquerón	Diciembre	6.60	27.40	8.34	35.00
Lajas	Diciembre	7.30	27.10	8.26	36.00
Boquerón	Enero	6.60	28.70	8.30	34.00
Lajas	Enero	6.80	28.90	8.31	35.00
Boquerón	Febrero	6.70	29.90	8.32	35.00
Lajas	Febrero	7.30	27.20	7.22	26.00
Boquerón	Marzo	7.20	29.40	8.26	32.00
Lajas	Marzo	6.90	27.70	8.26	35.00
Boquerón	Abril	7.20	28.90	8.34	34.00
Lajas	Abril	7.60	29.60	8.29	35.00

Boquerón	Mayo	7.00	28.60	8.21	34.00
Boquerón	Mayo	6.90	28.50	8.17	34.00
Lajas	Mayo	7.00	29.50	8.22	34.00
Boquerón	Junio	7.10	29.40	8.28	35.00
Lajas	Junio	6.50	30.10	8.35	35.00

*ND (No determinado) Indica que no se realizó muestreo debido a las inclemencias del tiempo.

Tabla 10. Parámetros físico-químicos en el agua de extracción de almejas de la zona suroeste de Puerto Rico durante el período de julio de 2003 a junio de 2004

Lugar monitoreado	Mes	Oxígeno disuelto (mg/l)	Temperatura (°C)	pH	Salinidad (‰)
Boquerón	Julio	6.40	27.50	8.05	37.00
Lajas	Julio	7.60	27.10	6.48	15.00 ^B
Boquerón	Agosto	6.70	27.00	8.18	34.00
Boquerón	Agosto	6.80	28.00	8.28	34.00
Lajas	Agosto	7.10	27.30	8.18	38.00
Boquerón	Septiembre	6.90	28.20	8.31	35.00
Lajas	Septiembre	6.40	27.50	8.05	37.00
Boquerón	Octubre	7.10	27.80	8.27	34.00
Lajas	Octubre	6.90	29.20	8.07	39.00
Boquerón*	Noviembre	ND	ND	ND	ND
Lajas	Noviembre	7.10	27.30	8.18	38.00
Boquerón	Diciembre	6.70	27.00	8.38	34.00
Lajas	Diciembre	6.40	27.80	8.24	36.00
Boquerón	Enero	6.30	27.50	8.26	34.00
Lajas	Enero	6.40	27.80	8.24	36.00
Boquerón	Febrero	6.10	27.00	8.04	34.00
Lajas	Febrero	7.00	29.00	8.15	34.00
Lajas	Febrero	6.50	29.70	8.15	34.00
Boquerón	Marzo	7.10	28.90	8.30	34.00
Lajas	Marzo	7.40	29.70	8.22	38.00
Boquerón	Abril	6.90	28.60	8.31	35.00
Lajas	Abril	6.60	27.90	8.36	39.00
Boquerón	Mayo	6.90	29.70	8.02	29.00
Lajas*	Mayo	ND	ND	ND	ND
Boquerón	Junio	6.00	31.00	8.30	34.00
Lajas	Junio	7.00	28.90	8.15	34.00

*ND (No determinado) Indica que no se realizó muestreo debido a las inclemencias del tiempo.

^B Medidas tomadas luego de días lluviosos.

Discusión

La distribución de vibrios en el ambiente, especialmente *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus*, ha sido reportada en la costa de los Estados Unidos por varios investigadores (1, 26, 27, 38, 39, 40, 42, 62). En zonas templadas como los E.U. la densidad de *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus* en el ambiente es mayor en los meses de verano (27, 42) debido a que prevalecen altas temperaturas. En este estudio se encontraron fluctuaciones en las poblaciones de los vibrios las cuales reflejan una tendencia similar a las zonas templadas (Figura 1 y 2). En países tropicales como Puerto Rico la temperatura es constante durante todas las temporadas del año, por consecuencia, la literatura sugiere que en estas zonas la densidad de vibrios se correlaciona con la salinidad del agua (36, 65). En este estudio no se encontró correlación alguna entre la salinidad y la densidad de vibrios en la columna de agua (Apéndice 13). Rivera y colaboradores (1998) demostraron que la salinidad no juega un rol importante en la regulación de vibrios en las costas norte y este de Puerto Rico (60). Según Rivera (60) la densidad de vibrios se correlaciona con la presencia de fosfatos y fósforo total en el ambiente. Este estudio intentó correlacionar la densidad de vibrios con el pH o la concentración de oxígeno disuelto pero no encontró relación alguna.

Posiblemente la tendencia reportada en este estudio en las densidades de vibrios podría estar influenciada por la presencia de taninos (8), la disponibilidad de nutrientes esenciales (como el hierro, el nitrógeno y el fósforo) (60), la asociación de los vibrios con el zooplancton (36), la presencia de bacteriófagos (5), la depredación y el factor competencia entre poblaciones (autotrófos vs. heterotrófos).

Estudios previos realizados en los trópicos no cuantifican *Vibrio parahaemolyticus* sino que establecen su presencia en aguas tropicales y bivalvos (7, 37, 50). Este estudio realizado a lo largo de un año en las aguas de extracción y bivalvos de la zona suroeste de Puerto Rico permite establecer una base de datos sobre el perfil microbiológico de éstos. Se encontró que las densidades de vibrios fluctuaban entre 0.48 hasta 5.04 log₁₀ ufc de vibrios g⁻¹ de bivalvo o ml⁻¹ de agua. Aunque estos niveles se consideran bajos existe la probabilidad de que ocurra un brote de vibriosis a través del consumo de bivalvos crudos. Este riesgo es agravado por el manejo típico que reciben los bivalvos luego de su cosecha. La práctica local en el comercio de bivalvos conlleva refrigeración lo que favorece el incremento en los números de *Vibrio parahaemolyticus*.

A nivel mundial se ha observado que el consumo de mariscos crudos como los bivalvos, puede culminar en casos de enfermedad gastrointestinal (59, 64). Como consecuencia de ello se han creado programas regulatorios que supervisan la industria de bivalvos en diversos países, como por ejemplo la NSSP en los Estados Unidos. La NSSP ha establecido guías para la cosecha de bivalvos basadas en el análisis de coliformes fecales, vibrios y el recuento total en platos con el fin de asegurar que éstos son aptos para consumo humano (10). La densidad de *Vibrio parahaemolyticus* en los ostiones cosechados en Boquerón excedieron el nivel sugerido por la NSSP para la seguridad del consumidor en los meses de julio y marzo (Figura 1). Para los ostiones de Lajas se excedió el nivel en el mes de agosto (Figura 2). En el caso de las almejas, sólo las de Lajas en el mes de agosto incumplieron los límites sugeridos por la NSSP (Figura 3 y 4).

El hecho de que ya estas muestras sobrepasan los límites establecidos por la NSSP y el producto es almacenado a temperatura ambiente en el área de venta, se incrementa la posibilidad de que los consumidores puedan desarrollar vibriosis.

Las coliformes fecales se utilizan como indicadores de contaminación fecal por la NSSP para clasificar las aguas de cosecha de bivalvos en E.U. Estudios previos han demostrado que no se puede correlacionar la presencia de virus y algunas bacterias entéricas cuyo reservorio natural es el ambiente acuático, con los niveles de coliformes fecales (34). En este estudio, *Escherichia coli* se aisló de los bivalvos y las aguas de extracción de ambos lugares monitoreados con una incidencia de 25%. Aproximadamente el 75% de todos los aislados examinados tenían características fenotípicas y bioquímicas similares a las de *Escherichia coli*. Sin embargo la identificación por el sistema API 20E reveló que en su mayoría eran *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella planticola*. La mayoría de las muestras examinadas (96%) para el análisis de coliformes fecales se mantuvo en cumplimiento con los estándares de la NSSP (Figura 3 y 4). Los ostiones y las aguas de extracción de ambos lugares no sobrepasaron los límites establecidos por la NSSP en ninguno de los meses. En el caso de las almejas en ninguna de las muestras se excedieron los límites de la NSSP mientras que en el agua de cosecha de almejas sólo las de Boquerón no cumplieron e el mes de enero.

Ante la presencia de coliformes fecales, podría esperarse a *Salmonella* en algunas de las muestras. Desde la perspectiva de salud pública, el consumo de bivalvos crudos alrededor del mundo se asocia con la probabilidad de contaminación con *Salmonella*

(47). Durante el transcurso de esta investigación no se detectó la presencia de *Salmonella* en ninguna de las muestras analizadas. A través de los procedimientos para la aislación de esta bacteria se recuperaron diferentes miembros de la familia Enterobacteriaceae, algunos de los cuales se consideran patógenos oportunistas. Entre los aislados se encuentran *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Shigella* spp., *Enterobacter cloacae*, *Proteus* spp., *Proteus mirabilis*, *Serratia liquefaciens*, *Morganella morganii* y *Citrobacter* spp. (Tabla 6). La ausencia de *Salmonella* en las muestras no se puede interpretar como que ésta bacteria posee una baja capacidad de supervivencia en este hábitat. Por el contrario, se ha comprobado que diversas cepas virulentas de *Salmonella* spp. tienen la capacidad de sobrevivir por períodos largos en sistemas acuáticos (como ríos, lagos, aguas residuales, escorrentías de lluvias y sedimentos) y adaptarse a éstos (6). Según los datos obtenidos en esta investigación se podría sugerir que *Salmonella* debe estar presente en niveles tan bajos que el método utilizado no es capaz de detectar o se encuentra en estado viable no cultivable.

Los recuentos totales aeróbicos se utilizan como indicador de niveles de microorganismos y como guía para la aceptabilidad de la calidad organoléptica en un producto. Recuentos altos de microorganismos en un medio general (como “Plate Count Agar”) no necesariamente muestran la posibilidad de riesgo de salud pública (10). Todas las muestras analizadas para el recuento total aeróbico se mantuvieron dentro de los límites establecidos por la NSSP (Figura 6 y 7).

Conclusiones

- La mayoría de las muestras analizadas en este estudio se encontraron dentro de las regulaciones de la NSSP para los niveles de vibrios, coliformes fecales y PCA.
- Las aguas de extracción de Boquerón y Lajas podrían clasificarse como “abiertas” para la cosecha de estos bivalvos.
- Las densidades de vibrios en zonas tropicales poseen una tendencia similar a la reportada en las zonas templadas pero no relacionada a la temperatura o la salinidad del agua.
- No existe correlación entre la salinidad, la concentración de oxígeno disuelto, la temperatura y el pH con la densidad de *Vibrio* spp.
- La densidad de *Vibrio* spp. posiblemente esté relacionada con la presencia de taninos, la disponibilidad de nutrientes, la asociación de los vibrios con el zooplankton, la presencia de bacteriófagos, la depredación y la competencia entre poblaciones.
- Se necesita determinar otros indicadores de calidad en bivalvos que posean la capacidad de detectar la presencia de virus y bacterias entéricas.

Recomendaciones

- Determinar la presencia de factores de virulencia en las bacterias aisladas en este estudio para poder alertar a los consumidores sobre los posibles riesgos.
- Estudiar la relación entre la asociación de vibrios con el zooplancton.
- Estudiar la composición de nutrientes y el efecto de otros factores bióticos ó abióticos del ambiente sobre la incidencia de vibrios.
- Estudiar la incidencia de *Salmonella* spp. en esta aguas a través del empleo de técnicas moleculares.
- Desarrollar tratamientos de depuración que disminuyan las poblaciones de vibrios y otras bacterias entéricas de los bivalvos.
- Diseñar guías preventivas que disminuyan la probabilidad de una intoxicación alimentaria a través del consumo de bivalvos crudos.
- Regular el comercio de bivalvos en Puerto Rico.
- Educar y concientizar a los consumidores de ostiones y almejas sobre los peligros biológicos potenciales a los que se exponen al ingerir estos animales crudos.
- Alertar a las agencias gubernamentales sobre los niveles de vibrios y coliformes fecales reportados en los dos lugares muestreados en esta investigación.
- Diseñar una base de datos en Puerto Rico que alerte sobre los casos de vibriosis ocurridos en la isla.
- Analizar el agua utilizada para almacenar temporalmente los ostiones y las almejas antes de ser vendidos al detal en Boquerón y Lajas.

Apéndices

Apéndice 1. Enfermedades entéricas de notificación obligatoria en Puerto Rico, 1999-2003 (Departamento de Salud de Puerto Rico)



Estado Libre Asociado de Puerto Rico
Departamento de Salud

Phone. (787) 773-0600 ext.251
Cel. (787) 485-2830
Fax. (787) 773-0622
E-mail: ygarcia@salud.gov.pr

Yaniré García Guadalupe, MPH

Bioestadística
División de Epidemiología

Bo. Monacillos Calle Casia #2
San Juan, P.R. 00921-3200



Estado Libre Asociado de Puerto Rico
Departamento de Salud
División de Epidemiología

Enfermedades Entéricas de Notificación Obligatoria Puerto Rico, 1999-2003

Enfermedad	Número de casos				
	1999	2000	2001	2002	2003
Amebiasis	0	1	1	1	4
Campylobacteriosis	24	38	39	38	35
Cólera	0	0	0	0	0
<i>E. coli</i> 0157:H7	9	7	2	1	3
Giardiasis	15	24	40	88	364
Hepatitis A	418	255	258	242	102
Listeriosis	0	0	0	2	0
Salmonelosis	715	742	972	660	798
Shigelosis	141	39	21	31	33
Yersiniosis	7	2	2	6	4

Fuente: Sistema de Vigilancia Enfermedades Transmisibles

Las enfermedades de notificación obligatoria tienen como base legal la Ley 81 del 14 de marzo de 1912, según enmendada. La lista de enfermedades notificables aparecen en la Orden Administrativa Núm. 177. Adjunto este documento.

Al momento la información solicitada de brotes por Intoxicación alimentaria la información está de forma manual y no computadorizada, lo que dificulta en este momento proveer la información.

Yaniré García, MPH
Bioestadística

Apéndice 2. Mapa geográfico de las áreas de muestreos ubicadas en Cabo Rojo y Lajas, Puerto Rico (Tomado de Adventure Guide to Puerto Rico)



Apéndice 3. Incidencia de *Vibrio* spp. mediante el uso de la técnica del NMP en los ostiones (*Crassostrea rhizophorae*) y en el agua de extracción de Boquerón, Puerto Rico durante el período de julio 2003 a junio de 2004

Mes	NMP de ostiones	ufc/g de ostiones	NMP de la zona de extracción	ufc/ml de la zona de extracción
Julio	3-3-3	110000.00	3-0-1	3800.00
Julio	3-3-3	110000.00	3-2-1	150.00
Agosto	3-3-0	2400.00	3-2-1	150.00
Septiembre	3-3-0	240.00	3-1-0	43.00
Octubre	1-0-0	3.60	0-0-0	3.00
Noviembre*	ND	ND	ND	ND
Diciembre	2-0-0	9.20	1-0-0	3.60
Enero	1-0-0	3.60	1-0-0	3.60
Febrero	3-2-1	150.00	2-1-1	20.00
Marzo	3-3-0	24000.00	3-0-0	23.00
Abril	2-0-0	9.20	3-0-0	23.00
Mayo	3-1-0	4300.00	3-2-0	930.00
Mayo	2-2-1	200.00	3-3-0	240.00
Junio	3-0-0	2300.00	3-0-0	2300.00

***ND** (No determinado) Indica que no se realizó muestreo debido a las inclemencias del tiempo.

Apéndice 4. Incidencia de *Vibrio* spp. mediante el uso de la técnica del NMP en los ostiones (*Crassostrea rhizophorae*) y en el agua de extracción de Lajas, Puerto Rico durante el período de julio 2003 a junio de 2004

Mes	NMP de ostiones	ufc/g de ostiones	NMP de la zona de extracción	ufc/ml de la zona de extracción
Julio	3-2-1	1500.00	3-3-1	4600.00
Agosto	3-3-1	4600.00	2-2-0	21.00
Septiembre	2-1-0	150.00	2-1-0	150.00
Octubre	2-1-0	15.00	1-0-0	3.60
Noviembre	1-1-0	7.40	1-0-0	3.60
Noviembre	1-1-0	7.40	1-0-0	3.60
Diciembre	1-0-0	3.60	1-0-0	3.60
Enero	2-1-0	15.00	1-1-0	7.40
Febrero	3-1-0	430.00	3-1-0	430.00
Marzo	2-2-1	28.00	2-1-1	20.00
Abril	2-1-0	15.00	1-0-0	3.60
Mayo	3-1-0	4300.00	3-2-0	930.00
Junio	3-2-1	150.00	3-0-0	23.00

Apéndice 5. Incidencia de *Vibrio* spp. mediante el uso de la técnica del NMP en las almejas (*Lucina pectinata*) y en el agua de extracción de Boquerón, Puerto Rico durante el período de julio 2003 a junio de 2004

Mes	NMP de almejas	ufc/g de almejas	NMP de la zona de extracción	ufc/ml de la zona de extracción
Julio	3-3-0	2400.00	3-2-0	930.00
Agosto	3-1-2	1200.00	3-2-1	1500.00
Agosto	2-1-0	150.00	2-0-0	92.00
Septiembre	2-1-0	15.00	1-0-0	3.60
Octubre	2-1-0	15.00	1-0-0	3.60
Noviembre*	ND	ND	ND	ND
Diciembre	1-0-0	3.60	1-0-0	3.60
Enero	1-0-0	3.60	1-0-0	3.60
Febrero	2-1-0	15.00	1-1-0	7.40
Marzo	3-3-0	2400.00	3-3-0	2400.00
Abril	3-2-0	930.00	3-2-1	150.00
Mayo	3-1-0	4300.00	3-2-1	1500.00
Junio	3-2-3	290.00	3-2-1	150.00

*ND (No determinado) Indica que no se realizó muestreo debido a las inclemencias del tiempo.

Apéndice 6. Incidencia de *Vibrio* spp. mediante el uso de la técnica del NMP en las almejas (*Lucina pectinata*) y en el agua de extracción de Lajas, Puerto Rico durante el período de julio 2003 a junio de 2004

Mes	NMP de almejas	ufc/g de almejas	NMP de la zona de extracción	ufc/ml de la zona de extracción
Julio	3-3-0	240.00	3-3-2	1100.00
Agosto	3-3-2	110000.00	3-3-0	240.00
Septiembre	3-3-0	2400.00	3-3-0	240.00
Octubre	1-0-0	3.60	0-0-0	3.00
Noviembre	1-0-0	3.60	0-0-0	3.00
Diciembre	1-0-0	3.60	1-0-0	3.60
Enero	1-0-0	3.60	1-0-0	3.60
Febrero	3-1-0	43.00	2-1-0	15.00
Febrero	3-2-0	930.00	3-2-0	930.00
Marzo	3-2-1	150.00	3-1-0	43.00
Abril	3-1-0	430.00	3-2-1	150.00
Mayo*	ND	ND	ND	ND
Junio	3-3-0	240.00	3-3-0	240.00

***ND** (No determinado) Indica que no se realizó muestreo debido a las inclemencias del tiempo.

Apéndice 7. Incidencia de coliformes fecales mediante el uso de la técnica del NMP en los ostiones (*Crassostrea rhizophorae*) y en el agua de extracción de Boquerón, Puerto Rico durante el período de julio 2003 a junio de 2004

Mes	NMP de ostiones	ufc/g de ostiones	NMP de la zona de extracción	ufc/ml de la zona de extracción
Julio	0-0-0	3.00	0-0-0	3.00
Julio	0-0-0	3.00	1-0-0	3.60
Agosto	2-0-0	9.20	1-0-0	3.60
Septiembre	0-0-0	3.00	0-0-0	3.00
Octubre	0-0-0	3.00	0-0-0	3.00
Noviembre*	ND	ND	ND	ND
Diciembre	0-0-0	3.00	0-0-0	3.00
Enero	1-0-0	3.60	1-0-0	3.60
Febrero	0-0-0	3.00	0-0-0	3.00
Marzo	1-0-0	3.60	2-0-0	9.20
Abril	0-0-0	3.00	3-0-0	23.00
Mayo	0-0-0	3.00	0-0-0	3.00
Mayo	0-0-0	3.00	0-0-0	3.00
Junio	0-0-0	3.00	0-0-0	3.00

***ND** (No determinado) Indica que no se realizó muestreo debido a las inclemencias del tiempo.

Apéndice 8. Incidencia de coliformes fecales mediante el uso de la técnica del NMP en los ostiones (*Crassostrea rhizophorae*) y en el agua de extracción de Lajas, Puerto Rico durante el período de julio 2003 a junio de 2004

Mes	NMP de ostiones	ufc/g de ostiones	NMP de la zona de extracción	ufc/ml de la zona de extracción
Julio	0-0-0	3.00	0-0-0	3.00
Agosto	0-0-0	3.00	0-0-0	3.00
Septiembre	0-0-0	3.00	0-0-0	3.00
Octubre	0-0-0	3.00	0-0-0	3.00
Noviembre	0-0-0	3.00	0-0-0	3.00
Noviembre	2-0-0	9.20	2-0-0	9.20
Diciembre	2-1-0	15.00	1-0-0	3.60
Enero	0-0-0	3.00	0-0-0	3.00
Febrero	1-0-0	3.60	0-0-0	3.00
Marzo	0-0-0	3.00	0-0-0	3.00
Abril	0-0-0	3.00	0-0-0	3.00
Mayo	3-1-0	43.00	1-0-0	3.60
Junio	0-0-0	3.00	0-0-0	3.00

Apéndice 9. Incidencia de coliformes fecales mediante el uso de la técnica del NMP en las almejas (*Lucina pectinata*) y en el agua de extracción de Boquerón, Puerto Rico durante el período de julio 2003 a junio de 2004

Mes	NMP de almejas	ufc/g de almejas	NMP de la zona de extracción	ufc/ml de la zona de extracción
Julio	3-0-0	300.00	0-0-0	3.00
Agosto	0-0-0	3.00	0-0-0	3.00
Agosto	0-0-0	3.00	0-0-0	3.00
Septiembre	0-0-0	3.00	0-0-0	3.00
Octubre	1-0-0	3.60	1-0-0	3.60
Noviembre*	ND	ND	ND	ND
Diciembre	2-1-0	15.00	1-1-0	7.40
Enero	1-0-0	3.60	3-2-0	93.00
Febrero	0-0-0	3.00	0-0-0	3.00
Marzo	1-0-0	3.60	0-0-0	3.00
Abril	0-0-0	3.00	0-0-0	3.00
Mayo	0-0-0	3.00	0-0-0	3.00
Junio	0-0-0	3.00	0-0-0	3.00

*ND (No determinado) Indica que no se realizó muestreo debido a las inclemencias del tiempo.

Apéndice 10. Incidencia de coliformes fecales mediante el uso de la técnica del NMP en las almejas (*Lucina pectinata*) y en el agua de extracción de Lajas, Puerto Rico durante el período de julio 2003 a junio de 2004

Mes	NMP de almejas	ufc/g de almejas	NMP de la zona de extracción	ufc/ml de la zona de extracción
Julio	0-0-0	3.00	0-0-0	3.00
Agosto	1-0-0	3.60	0-0-0	3.00
Septiembre	0-0-0	3.00	0-0-0	3.00
Octubre	0-0-0	3.00	0-0-0	3.00
Noviembre	0-0-0	3.00	0-0-0	3.00
Diciembre	1-0-0	3.60	1-0-0	3.60
Enero	1-1-0	7.40	1-0-0	3.60
Febrero	0-0-0	3.00	0-0-0	3.00
Febrero	0-0-0	3.00	0-0-0	3.00
Marzo	2-1-1	20.00	2-1-0	15.00
Abril	3-2-0	93.00	2-0-0	9.20
Mayo*	ND	ND	ND	ND
Junio	0-0-0	3.00	0-0-0	3.00

*ND (No determinado) Indica que no se realizó muestreo debido a las inclemencias del tiempo.

Apéndice 11. Recuentos totales aeróbicos en los ostiones (*Crassostrea rhizophorae*) y en el agua de extracción de bivalvos de la zona suroeste de Puerto Rico durante el período de julio 2003 a junio de 2004

Mes	UFC/g de ostiones de Boquerón	UFC/ml de agua de cosecha de Boquerón	UFC/g de ostiones de Lajas	UFC/ml de agua de cosecha de Lajas
Julio	30000.00	18500.00	190000.00	41000.00
Julio	25000.00	30000.00	350000.00	33000.00
Agosto	28000.00	25000.00	800.00	500.00
Septiembre	1300.00	500.00	500.00	250.00
Octubre	1000.00	1000.00	1500.00	300.00
Noviembre*	ND	ND	ND	ND
Diciembre	600.00	300.00	1000.00	500.00
Enero	300.00	250.00	300.00	250.00
Febrero	330.00	250.00	300.00	250.00
Marzo	600.00	400.00	2400.00	31000.00
Abril	1000.00	500.00	300.00	250.00
Mayo	1000.00	400.00	400.00	250.00
Mayo	2000.00	500.00	1800.00	600.00
Junio	1300.00	1200.00	300.00	250.00

*ND (No determinado) Indica que no se realizó muestreo debido a las inclemencias del tiempo.

Apéndice 12. Recuentos totales aeróbicos en almejas (*Lucina pectinata*) y en el agua de extracción de bivalvos de la zona suroeste de Puerto Rico durante el período de julio 2003 a junio de 2004

Mes	UFC/g de almejas de Boquerón	UFC/ml de agua de cosecha de Boquerón	UFC/g de almejas de Lajas	UFC/ml de agua de cosecha de Lajas
Julio	12000.00	2000.00	21000.00	900.00
Agosto	28000.00	18000.00	25000.00	18000.00
Agosto*	2000.00	1300.00	ND	ND
Septiembre	2000.00	1000.00	2000.00	1300.00
Octubre	2000.00	1000.00	250.00	250.00
Noviembre*	ND	ND	1000.00	250.00
Diciembre	400.00	250.00	700.00	250.00
Enero	2000.00	1400.00	300.00	250.00
Febrero	300.00	250.00	16000.00	1200.00
Febrero*	ND	ND	3100.00	2000.00
Marzo	1000.00	300.00	600.00	300.00
Abril	21000.00	3000.00	410000.00	26500.00
Mayo*	800.00	400.00	ND	ND
Junio	400.00	250.00	400.00	250.00

*ND (No determinado) Indica que no se realizó muestreo debido a las inclemencias del tiempo.

Apéndice 13. Análisis estadísticos de correlación entre la densidad de vibrios y las variantes físico-químicas de las zonas de extracción

Coefficientes de correlación

Almejas y zonas de extracción de Boquerón

Correlación de Spearman: coeficientes\ probabilidades

	Alm Boq	Agua Alm Boq	Oxígeno disuelto	Temperatura	pH	Salinidad
Alm Boq	1.00	1.8E-03	0.35	0.11	0.23	0.66
Agua Alm Boq	0.94	1.00	0.59	0.20	0.31	0.86
Oxígeno disuelto	0.28	0.16	1.00	0.24	0.40	0.64
Temperatura	0.49	0.38	0.35	1.00	0.51	0.83
pH	-0.36	-0.31	0.25	0.20	1.00	0.14
Salinidad	0.13	0.05	0.14	0.06	0.45	1.00

Coefficientes de correlación

Almejas y zonas de extracción de Lajas

Correlación de Spearman: coeficientes\ probabilidades

	Alm Lajas	Agua Alm Lajas	Oxígeno disuelto	Temperatura	pH	Salinidad
Alm Lajas	1.00	0.01	0.70	0.79	0.49	0.90
Agua Alm Lajas	0.84	1.00	0.48	0.72	0.21	0.11
Oxígeno disuelto	0.12	0.22	1.00	0.64	0.47	0.97
Temperatura	-0.08	-0.11	-0.14	1.00	0.69	0.72
pH	-0.21	-0.38	-0.22	0.12	1.00	0.16
Salinidad	-0.04	-0.48	-0.01	0.11	0.43	1.00

Coefficientes de correlación

Ostiones y zonas de extracción de Boquerón

Correlación de Spearman: coeficientes\ probabilidades

	Ost Boq	Agua Ost Boq	Oxígeno disuelto	Temperatura	pH	Salinidad
Ost Boq	1.00	0.01	0.87	0.98	0.10	0.97
Agua Ost Boq	0.76	1.00	0.86	0.84	0.06	0.48
Oxígeno disuelto	0.05	0.05	1.00	0.13	0.21	0.08
Temperatura	0.01	0.06	0.44	1.00	0.42	0.91
pH	-0.47	-0.54	-0.36	-0.23	1.00	0.05
Salinidad	0.01	0.20	-0.51	-0.03	0.56	1.00

Coefficientes de correlación

Ostiones y zonas de extracción de Lajas

Correlación de Spearman: coeficientes\ probabilidades

	Ost Lajas	Agua ost Lajas	Oxígeno disuelto	Temperatura	pH	Salinidad
Ost Lajas	1.00	2.5E-03	0.68	0.40	0.68	0.13
Agua ost Lajas	0.87	1.00	0.91	0.69	0.74	0.26
Oxígeno disuelto	0.12	0.03	1.00	0.51	0.03	0.57
Temperatura	0.24	0.12	-0.19	1.00	0.14	0.22
pH	-0.12	-0.10	-0.62	0.43	1.00	0.06
Salinidad	-0.44	-0.33	-0.16	0.35	0.55	1.00

Literatura Citada

1. Abbott, S., C. Powers, C. Kaysner, Y. Takeda, M. Ishibashi, S. Joseph, and J. Janda. 1989. Emergence of a restricted bioserovar of *Vibrio parahaemolyticus* as the predominant cause of *Vibrio*-associated gastroenteritis on the West Coast of the United States and Mexico. *J. Clin. Microbiol.* 27: 2891-2893.
2. APHA. 2001. Compendium of methods for the examination of food. 4th edition. American Public Health Association, Washington, DC, p. 69-80.
3. APHA. 1970. Recommended procedures for the examination of seawater and shellfish. 4th edition. American Public Health Association, Washington, DC, p. 1-121.
4. Barker, W., P. Mackowiak, M. Fishbein, G. Morris, J. D'Alfonso, G. Hauser, and O. Felsenfeld. 1974. *Vibrio parahaemolyticus* gastroenteritis outbreak in Covington, Louisiana, in August 1972. *Am. J. Epidemiol.* 100: 316-323.
5. Baross, J., J. Liston and R. Morita. 1978. Ecological relationship between *Vibrio parahaemolyticus* and agar-digesting vibrios as evidenced by bacteriophage susceptibility patterns. *Appl. Environ. Microbiol.* 36: 500-505.
6. Baudart, J., K. Lemarchand, A. Brisabois y P. Lebaron. 2000. Diversity of *Salmonella* strains isolated from the aquatic environment as determined by serotyping and amplification of the ribosomal DNA spacer regions. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1544-1552.
7. Bockemuhl, J. and A. Triemer. 1974. Ecology and epidemiology of *Vibrio parahaemolyticus* on the coast of Togo. *Bull. World Health Org.* 51: 353-360.
8. Boneta-Alcover, I. 2001. Comparación del efecto inhibitorio del extracto de *Rhizophorae mangle* L. (mangle rojo) en organismos productores de sideróforos y en *Vibrio parahaemolyticus* aislado de *Crassostrea rhizophorae* Guilding (ostión de mangle). Tesis M.S. Universidad de Puerto Rico, Mayagüez, P.R.
9. Burkhardt, W., W. Watkins and S. Rippey. 1992. Seasonal effects on accumulation of microbial indicator organisms by *Mercenaria mercenaria*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 826-831.
10. Center for Food Safety and Applied Nutrition (CFSAN). U.S. Food and Drug Administration. 2001. Fish and fisheries products hazards and controls guidance. 3rd edition. National seafood HACCP alliance for training and education.

11. Center for Food Safety and Applied Nutrition (CFSAN). U.S. Food and Drug Administration. 1999. Bad Bug: *Vibrio parahaemolyticus*.
12. Center for Food Safety and Applied Nutrition (CFSAN). U.S. Food and Drug Administration. 1999. Bad Bug: *Vibrio vulnificus*.
13. Center for Food Safety and Applied Nutrition (CFSAN). U.S. Food and Drug Administration. 1998. Bacteriological Analytical Manual (BAM). 8th edition, Revision A. Association of Official Analytical Chemists International. Division of Microbiology, Gaithersburg, MD.
14. Center for Food Safety and Applied Nutrition (CFSAN). U.S. Food and Drug Administration. Centers for Diseases Control and Prevention. 1996. *Vibrio vulnificus* infections associated with raw oyster consumption-Los Angeles, 1996. Morb. Mortal. Wkly. Rep. 44.
15. Center for Food Safety and Applied Nutrition (CFSAN). U.S. Food and Drug Administration. Centers for Diseases Control and Prevention. 1993. *Vibrio vulnificus* infections associated with raw oyster consumption-Florida, 1981-1992. Morb. Mortal. Wkly. Rep. 42.
16. Centers for Diseases Control and Prevention and Food and Drug Administration. 2000. CDC and FDA statement on *Vibrio parahaemolyticus*. Note to correspondents.
17. Centers for Diseases Control and Prevention. 1999. Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* infection associated with eating raw oysters and clams harvested from Long Island Sound-Connecticut, New Jersey and New York, 1998. Morb. Mortal. Wkly. Rep. 48: 48-51.
18. Cervereny, K., A. DePaola, D. Duckworth and P. Gulig. 2002. Phage therapy of local systemic disease caused by *Vibrio vulnificus* in iron-dextran-treated mice. Infect. Immun. 70: 6251-6262.
19. Chen, Y., M. Chang, Y. Chuang and C. Jeang. 2005. Characterization and virulence of hemolysin III from *Vibrio vulnificus*. Current. Microbiol. 49: 175-179.
20. Chi-Ying, L., G. Panicker and A. Bej. 2003. Detection of pathogenic bacteria in shellfish using multiplex PCR followed by CovaLinkTM NH microwell plate sandwich hybridization. J. Microbiol. Meth. 53: 199-209.
21. Colwell, R., P. Brayton, D. Grimes, D. Roszak, S. Huq and L. Palmer. 1985. Viable but nonculturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment: implications for release of genetically engineered microorganism. Bio/Tech. 3: 817-820.

22. Cook, D., P. O'Leary, J. Hunsucker, E. Sloan, J. Bowers, R. Blodgett and A. DePaola. 2002. *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* in U.S. retail shell oysters: A national survey from June 1998 to July 1999. J. Food Prot. 65: 79-87.
23. Daniels, N., B. Ray, A. Easton, N. Marano, E. Kahn, A. McShan, L. Del Rosario, T. Baldwin, M. Kinggsley, N. Puhr, J. Wells and F. Angulo. 2000. Emergence of new *Vibrio parahaemolyticus* serotype in raw oysters. JAMA 284: 1541-1545.
24. Daniels, N., L. Mac Kinnon, R. Bishop, S. Altekruse, B. Ray, R. Hammond, S. Thompson, S. Wilson, N. Bean, P. Griffin and L. Slutsker. 2000. *Vibrio parahaemolyticus* infections in the United States, 1973-1998. J. Infect. Dis. 181: 1661-1666.
25. De Jesús-Crespo, F. L. 2002. Incidencia de *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus* en ostiones (*Crassostrea rhizophorae*) de Boquerón, Puerto Rico. Tesis M.S. Universidad de Puerto Rico, Mayagüez, P.R.
26. DePaola, A., C. Kaysner, J. Bowers and D. Cook. 2000. Environmental investigations of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters after outbreaks in Washington, Texas and New York (1997 and 1998). Appl. Environ. Microbiol. 66: 4649-4654.
27. DePaola, A., L. Hopkins, J. Peeler, B. Wentz and R. McPhearson. 1990. Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* in U.S. coastal waters and oysters. Appl. Environ. Microbiol. 56: 2299-2302.
28. Dileep, V., Y. Kumar, M. Nishibuchi and Karunasagar, I. 2003. Application of polymerase chain reaction for detection of *Vibrio parahaemolyticus* associated with tropical seafood and coastal environment. Lett. Appl. Microbiol. 36: 423-427.
29. Estado Libre Asociado de Puerto Rico. Departamento de Salud. División de Epidemiología. 2004. Enfermedades entéricas de notificación obligatoria en Puerto Rico, 1999-2003.
30. García, J., C. Schmitt, C. Herberer and A. Winter. 1998. La Parguera, Puerto Rico. U.S.A. CARICOMP. p. 195-212.
31. Genthner, F., A. Voleti, L. Oliver and W. Fisher. 1999. Factors influencing *in vitro* killing of bacteria by hemocytes of the Eastern oyster (*Crassostrea virginica*). Appl. Environ. Microbiol. 65: 3015-3020.

32. González-Seda, R. J. 2001. El rol de la disponibilidad de hierro en la producción de sideróforos en *Vibrio parahaemolyticus* aislado de ostiones del área de mangle rojo en Puerto Rico. Tesis M.S. Universidad de Puerto Rico, Mayagüez, P.R.
33. Hackney, C. and A. Dicharry. 1988. Seafood-borne bacterial pathogens of marine origin. Food Tech. 42: 104-109.
34. Hood, M. Ness, G. and J. Blake. 1983. Relationship among fecal coliforms, *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. in shellfish. Appl. Environ. Microbiol. 45:122-126.
35. Institute of Medicine. 1991. Sea food safety. 1st ed. National Academies Press, Washington, D.C. p. 53-55.
36. Joseph, S., R. Colwell and J. Kaper. 1983. *Vibrio parahaemolyticus* and related halophilic vibrios. Crit. Rev. Microbiol. 10: 77-123.
37. Joseph, S. 1974. Observations on *Vibrio parahaemolyticus* in Indonesia. In Fujino, T., Sakazaki, R. and Takeda, Y. (ed). International Symposium on *Vibrio parahaemolyticus*. Saikon Publishing Co., Tokio. p. 35-39.
38. Kaneko, T. and R. Colwell. 1978. The annual cycle of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay, Microbial. Ecol. 4: 135-139.
39. Kaneko, T. and R. Colwell. 1974. Distribution of *Vibrio parahaemolyticus* and related organisms in the Atlantic Ocean off South Carolina and Georgia. Appl. Microbiol. 28: 1009-1017.
40. Kaneko, T. and R. Colwell. 1973. Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay. J. Bacteriol. 113: 24-27.
41. Kaufman, G., M. Myers, C. Pass, A. Bej and C. Kaysner. 2002. Molecular analysis of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from human patients and shellfish during US Pacific North-West outbreaks. Lett. Appl. Microbiol. 34: 155-161.
42. Kelly, M. and E. Stroh. 1988. Temporal relationship of *Vibrio parahaemolyticus* in patients and the environment. J. Clin. Microbiol. 26: 1754-1756.
43. Koga, T. and K. Takumi. 1995. Siderophore production and outer membrane protein synthesis of *Vibrio parahaemolyticus* strain with different serotypes under iron limited condition. J. Gen. Appl. Microbiol. 41: 221-228.
44. Kuriyama, K. 1964. Biological and immunological studies on the DNA derived from *Vibrio parahaemolyticus*: On the purification of the toxin fraction isolated from *Vibrio parahaemolyticus*. Jap. J. Bacteriol. 19: 418-424.

45. Lyman, R. and M. Longnecker. 2001. An introduction to statistical methods and data analysis. 5th edition. Duxbury and Thomson learning. California, USA, p. 531-600.
46. Mackie, C. and T. Birkbeck. 1992. Siderophore produced by *Vibrio anguillarum* *in vitro* and in infected rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). J. Fish Dis. 15: 37-45.
47. Martinez, J., M. Saco, G. Hernández, A. Lozano, O. García and J. Espinosa. 2003. Identification of *Salmonella* serovars isolated from live molluscan shellfish and their significance in the marine environment. J. Food Protect. 66: 226-232.
48. Mizunoe, Y., S. Nyunt, T. Ishikawa, A. Takade and S. Yoshida. 2000. Resuscitation of viable but noncultureable cells of *Vibrio parahaemolyticus* induced at low temperature under starvation. Microbiol. Lett. 186: 115-120.
49. Miyamoto, Y., Y. Obara, S. Akiyama, K. Takizawa and S. Yamai. 1969. *In vitro* hemolytic characteristic of *Vibrio parahaemolyticus*: its close correlation with human pathogenicity. J. Bacteriol. 100: 1147-1149.
50. Molitoris, E., S. Joseph, M. Krichensky, W. Sindhuhardja and R. Colwell. 1985. Characterization and distribution of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus* isolated in Indonesia. Appl. Environ. Microbiol. 50: 1388-1394.
51. Nijkawa, T., Y. Obara, S. Yamai and Y. Miyamoto. 1972. Purification of a hemolysin from *Vibrio parahaemolyticus*. Jap. J. Med. Sci. Biol. 25: 197-200.
52. Nishibuchi, M., A. Fasano, R. Russell and J. Kaper. 1992. Enterotoxigenicity of *Vibrio parahaemolyticus* with and without genes encoding thermostable direct hemolysin. Infect. Immun. 60: 3539-3545.
53. Nordstrom, J. and A. DePaola. 2003. Improved recovery of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* from oysters using colony hybridization following enrichment. J. Microbiol. Meth. 52: 273-277.
54. Okuda, J., M. Ishibaschi, S. Abbott, M. Janda and M. Nishibuchi. 1997. Analysis of the thermostable direct hemolysin (*trh*) genes in urease-positive strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated on the West coast of the United States. J. Clin. Microbiol. 35: 1965-1971.
55. Olafsen, J., H. Mikkelsen, H. Giaever and G. Hansen. 1993. Indigenous bacteria in hemolymph and tissues of marine bivalves at low temperatures. Appl. Environ. Microbiol. 59: 1848-1854.

56. Oliver, J. 1981. The pathogenicity and ecology of *Vibrio vulnificus*. J. Marine Technol. Soc. 15: 45-50.
57. Parés-Arroyo, M. 2003. Severa la contaminación de alimentos. El Nuevo Día, San Juan, Puerto Rico, Marzo 13, 2003, p.15.
58. Pfeffer, C., F. Hite and J. Oliver. 2003. Ecology of *Vibrio vulnificus* in estuarine waters of Eastern North Carolina. Appl. Environ. Microbiol. 69: 3526-3531.
59. Quadri, F., M. Shamsul, M. Nishibuchi, T. Rahman, J. Alam, J. Chisti, S. Kondo, J. Sugiyama, N. Bhuiyan, M. Mathan, D. Sack and G. Balakrish. 2003. Adaptative and inflammatory immune responses in patients infected with strains of *Vibrio parahaemolyticus*. J. Infect. Dis. 187: 1085-1097.
60. Rivera, S., T. Lugo and T. Hazen. 1998. Autecology of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* in tropical waters. Tesis M.S. Universidad de Puerto Rico, Río Piedras, P.R.
61. Roszak, D., D. Grimes and R. Colwell. 1984. Viable but nonrecoverable stages of *Salmonella enteritidis* in aquatic systems. Can. J. Microbiol. 30: 334-338.
62. Shapiro, R., S. Altekruse, L. Hutwagner, R. Bishop, R. Hammond, S. Wilson, B. Ray, S. Thompson, R. Tauxe, P. Griffin and *Vibrio* working group. 1998. The role of Gulf Coast oysters harvested in warmer months in *Vibrio vulnificus* infections in the United States, 1988-1996. J. Infect. Dis. 178: 752-759.
63. Simpson, L., V. White, S. Zane and J. Oliver. 1987. Correlation between virulence and colony morphology in *Vibrio vulnificus*. Infect. Immun. 55: 269-272.
64. Tuyet, D., V. Dinh, L. Seidleing, A. Chowdhury, E. Park, D. Canh, B. Trong, T. Van, A. Naficy, M. Raghav, M. Ali, H. Lee, T. Hung, M. Nichibuchi, J. Clemens and D. Duc. 2002. Clinical, epidemiological and socioeconomic analysis of an outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* in Khann Hoa Province, Vietnam. J. Infect. Dis., 186: 161-163.
65. U. S. Food and Drug Administration. National Marine Fisheries Services. Interstate shellfish sanitation conference. 1994. Proceedings of the 1994 *Vibrio vulnificus* workshop. Second edition. p. 120-122.
66. Wolf, M. and J. Crosa. 1986. Evidence of the role of a siderophore in promoting *Vibrio anguillarum* infections. J. Gen. Microbiol. 132: 2949-2952.

67. Zen-Yoji, H., Y. Kudoh, H. Igarashi, K. Otha and K. Fukai. 1974. Purification and identification of enteropathogenic toxins "a" and "a'" produced by *Vibrio parahaemolyticus* and their biological and pathological activities. In Fujino, T., Sakazaki, R. and Takeda, Y. (ed). International Symposium on *Vibrio parahaemolyticus*. Saikon Publishing Co., Tokio. p. 237-243.