

# INDICE:

|  |    |
|--|----|
| <b>CAPITULO 1: DEPURACION: IDEAS GENERALES</b> .....   | 7  |
| <b>CAPITULO 2: MICROBIOLOGIA DE LAS AGUAS MARINAS EN RELACION A LAS TOXIINFECCIONES ALIMENTARIAS POR CONSUMO DE MOLUSCOS</b> ..... | 11 |
| 1. VIRUS .....   | 11 |
| 2. BACTERIAS .....   | 11 |
| <b>2.1. Características generales</b> .....  | 11 |
| <b>2.2 Características de las bacterias marinas</b> .....  | 14 |
| <b>2.3. Distribución</b> .....   | 15 |
| 3. CIANOFICEAS .....   | 15 |
| 4. FITOPLANCTON, PORTADOR DE TOXINAS: DINOFLAGELADOS .....   | 15 |
| 5. HONGOS .....  | 16 |
| 6. MICROFAUNA: ZOOPLANCTON .....   | 16 |
| <b>CAPITULO 3: VERTIDOS, MICROORGANISMOS Y ENFERMEDADES</b> .....  | 19 |
| 1. MICROORGANISMOS DE AGUAS RESIDUALES .....   | 19 |
| 2. PERIODO DE SUPERVIVENCIA .....  | 19 |
| 3. CONSUMO DE MOLUSCOS Y ENFERMEDAD .....  | 20 |
| <b>3.1. Fiebre tifoidea y paratifoidea. Salmonelosis</b> .....   | 20 |
| <b>3.2. Infección por <i>Vibrio parahaemolyticus</i></b> .....   | 20 |
| <b>3.3. Cólera por <i>Vibrio cholerae</i></b> .....  | 21 |
| <b>3.4. Disenteria bacilar</b> .....   | 21 |
| <b>3.5. Hepatitis viral del tipo A</b> .....   | 21 |
| <b>3.6. Picornavirus</b> .....   | 21 |
| <b>CAPITULO 4: ANATOMIA Y FISIOLOGIA DE LOS MOLUSCOS EN RELACION A LA INGESTION DE ALIMENTO</b> .....                              | 24 |
| 1. FILTRACION Y ALIMENTACION .....   | 24 |
| <b>1.1. Anatomía de la filtración y retención de partículas</b> .....  | 24 |
| 1.1.1. Los sifones .....   | 25 |
| 1.1.2. Las branquias .....   | 25 |
| 1.1.3. El aparato digestivo .....  | 26 |
| <b>1.2. Mecanismos de filtración y retención de partículas</b> .....   | 26 |
| 1.2.1. La circulación del agua .....   | 26 |
| 1.2.2. De las branquias a la boca .....  | 26 |
| 1.2.3. En el aparato digestivo .....   | 26 |
| 2. FILTRACION, ALIMENTACION Y CONCENTRACION BACTERIANA .....   | 26 |
| <b>2.1. Influencia de la temperatura</b> .....   | 27 |
| <b>2.2. Influencia de la salinidad</b> .....   | 28 |
| <b>2.3. Influencia del oxígeno disuelto</b> .....  | 28 |
| <b>2.4. Influencia de la turbidez</b> .....  | 29 |
| <b>2.5. Condiciones óptimas</b> .....  | 29 |
| <b>CAPITULO 5: AGENTES Y SISTEMAS DE DEPURACION DE AGUAS MARINAS APLICADOS A LA DEPURACION DE MOLUSCOS</b> .....                   | 31 |
| 1. CLORACION .....   | 31 |
| <b>1.1. Dosis</b> .....  | 32 |
| <b>1.2. Técnica</b> .....  | 32 |
| <b>1.3. Ventajas e inconvenientes</b> .....  | 33 |
| 2. OZONACION .....   | 33 |
| <b>2.1. Técnica</b> .....  | 34 |
| 3. ESTERILIZACION POR RADIACION ULTRAVIOLETA .....   | 34 |
| <b>3.1. Técnica</b> .....  | 34 |
| <b>3.2. Dosis</b> .....  | 35 |
| <b>3.3. La radiación U.V. en la depuración de grandes volúmenes</b> .....  | 35 |
| 4. U.V. - GENERADOR DE OZONO .....   | 35 |

|  |           |
|--|-----------|
| 5. METODO DEL CLORO NACIENTE.....  | 36        |
| 6. GENERACION DE CLORO NACIENTE MIXTO CON OZONO.....                         | 36        |
| 7. IODOFOROS.....  | 36        |
| 8. ULTRASONIDOS.....   | 36        |
| 9. ION STICK.....  | 36        |
| <b>CAPITULO 6: UNIDADES ESTRUCTURALES DE LAS ESTACIONES DEPURADORAS.....</b> | <b>38</b> |
| 1. EMPLAZAMIENTO Y CAPTACION DE AGUA.....                                    | 38        |
| 2. ESTACION DE BOMBEO.....   | 39        |
| 3. UNIDAD DE TRATAMIENTO DEL AGUA.....                                       | 40        |
| 4. ELIMINACION DEL AGENTE OXIDANTE.....                                      | 40        |
| 5. PISCINAS DE DEPURACION.....   | 41        |
| 6. SISTEMA DE DEPURACION DE VERTIDOS DE LA DEPURADORA.....                   | 42        |
| 7. LABORATORIO DE CONTROL.....   | 42        |
| 8. AREAS AUXILIARES.....   | 43        |
| <b>CAPITULO 7: DIMENSIONAMIENTO DE PISCINAS Y TANQUES.....</b>               | <b>45</b> |
| 1. DIMENSIONAMIENTO DE PISCINAS DE ESTABILACION.....                         | 45        |
| 2. CALCULOS DEL CAUDAL.....  | 46        |
| 3. DIMENSIONAMIENTO DE TANQUES EN LOS QUE ACTUA EL AGENTE OXIDANTE.....      | 46        |
| <b>3.1. Cloro</b> .....  | 46        |
| <b>3.2. Ozono</b> .....  | 46        |
| <b>CAPITULO 8: FUNCIONAMIENTO Y TRABAJO EN UNA DEPURADORA.....</b>           | <b>47</b> |
| 1. RECEPCION.....  | 47        |
| 2. ESTABILACION.....   | 47        |
| 3. LA DEPURACION.....  | 47        |
| 4. EMBALADO Y ETIQUETADO.....  | 48        |
| 5. CONTROL DE LA DEPURACION.....   | 48        |
| <b>5.1. Procedimientos de control</b> .....                                  | 48        |
| 5.1.1. Concepto de organismo indicador.....                                  | 49        |
| 5.1.2. <i>Escherichia coli</i> .....   | 49        |
| 5.1.3. Coliformes totales.....   | 49        |
| 5.1.4. Coliformes fecales.....   | 50        |
| 5.1.5. <i>Streptococos del Grupo D Lancefield</i> .....                      | 50        |
| <b>5.2. <i>Vibrio parahaemoliticus</i></b> .....                             | 50        |
| <b>5.3. <i>Salmonella</i></b> .....  | 50        |
| <b>5.4. Preparación de muestras de moluscos</b> .....                        | 51        |
| 5.4.1. Carne sola.....   | 51        |
| 5.4.2. Carne más líquido intervalvar.....                                    | 51        |
| <b>5.5. Preparación de muestras de agua de mar</b> .....                     | 51        |
| <b>5.6. Análisis</b> .....   | 51        |
| <b>5.7. Criterio microbiológico</b> .....                                    | 53        |
| <b>5.8. Métodos analíticos</b> .....   | 54        |
| 5.8.1. Preparación de diluciones decimales.....                              | 54        |
| 5.8.2. Investigación y recuento de Coliformes.....                           | 54        |
| 5.8.3. Investigación y recuento de <i>E. Coli</i> .....                      | 56        |
| 5.8.4. Análisis de <i>Enterobacteriaceae</i> totales.....                    | 56        |
| <b>TERMINOS DE ESTE TEXTO RECOGIDOS EN EL GLOSARIO.....</b>                  | <b>58</b> |



# 1

## Depuración. Ideas generales

### 1 DEPURACION. IDEAS GENERALES

Los moluscos bivalvos, son animales que se alimentan, por filtración, de fitoplancton y partículas de materia orgánica en suspensión en las aguas del mar. A través de su cavidad paleal hacen circular una cierta cantidad de agua que les aporta el oxígeno disuelto necesario para la respiración, fitoplancton y materia orgánica particulada.

Con el agua y el alimento, vienen también multitud de microorganismos. Unos, integrantes naturales del ecosistema marino y otros procedentes de aportes extraños al medio natural. Tanto unos como otros se acumulan durante cierto tiempo, en el tubo digestivo u otros órganos del bivalvo.

En consecuencia, este mecanismo de alimentación y respiración -la filtración-, si por un lado, representa una gran ventaja para los cultivos, por el otro, tiene un gran inconveniente: que dichos moluscos acumulan (sobre todo en el aparato digestivo) los microorganismos patógenos que pueda haber en el agua que los envuelve y que, por esa acumulación, aunque en el agua no alcancen una concentración peligrosa, sí pueden alcanzarla en el interior del animal.

Las personas, al consumir los moluscos crudos o ligeramente cocidos, incorporan esos gérmenes con el riesgo subsiguiente de contraer alguna enfermedad o trastorno, ampliando el número de toxiinfecciones alimentarias.

Esta circunstancia impone la necesidad de someter a los moluscos destinados a este tipo de consumo a un proceso que elimine, por un método no traumático para el animal, los microorganismos patógenos que pueda contener en su interior. Ese proceso es la depuración.



*La contaminación microbiana patógena suele tener su origen en vertidos incontrolados al mar.*

#### Contenido

#### 1. Depuración. Ideas generales





**Los vertidos al mar, sin control ni depuración previa, son muy frecuentes.**

Teóricamente, aquellos moluscos procedentes de aguas oceánicas o abiertas, limpias, exentas prácticamente de gérmenes patógenos, no poseen microorganismos patógenos en su interior, por lo que, en este aspecto, su consumo, incluso en crudo, apenas daría lugar a problemas sanitarios.

Sin embargo, en la actualidad y en las zonas costeras, las aguas limpias y sin gérmenes, son infrecuentes; sobre todo en zonas de cultivo y recogida de moluscos, bahías o estuarios abrigados, donde la densidad de población es grande y, con ello, la contaminación de las aguas creciente. Las aguas de estas zonas litorales, suelen tener unas concentraciones de microbios patógenos superiores a las que las distintas administraciones sanitarias consideran de peligro.

El origen fundamental de esta contaminación microbiana está en los vertidos incontrolados al mar, sin depuración previa, de aguas residuales urbanas, especialmente las fecales, agrícolas e industriales. Desgraciadamente, este tipo de vertidos, son frecuentes y generalizados en la mayor parte de los países y, concretamente en las rías gallegas, de donde procede más del 90% de la producción española de moluscos.

Con el fin de garantizar la depuración de los moluscos se establecieron en España y otros países las Estaciones Depuradoras, más comunmente conocidas como Depuradoras de Moluscos. Estas Estaciones están definidas legalmente como: "Establecimientos dotados de las instalaciones necesarias para conseguir la eliminación en los moluscos vivos de gérmenes patógenos para el consumo humano, inmediatamente antes de su envasado en el mismo centro".

**La depuración es un proceso obligatorio al que deben ser sometidos los moluscos al consumo en crudo.**



En esencia una depuradora es, por tanto, una industria en la que se reciben moluscos vivos y de la que tras un proceso de depuración salen moluscos vivos depurados, es decir, aptos para el consumo humano en crudo.

Este proceso de depuración consiste en mantenerlos durante un cierto tiempo en agua teóricamente estéril aunque en la práctica no lo es, si no solamente depurada, es decir, "limpia de gérmenes" o sea, sin ellos o con un nivel muy bajo, no patógeno, de ellos. Durante ese tiempo de depuración, que según la legislación vigente debe ser como mínimo de 42 horas, los moluscos se encuentran en el agua depurada filtrando, llenando su tubo digestivo con materia orgánica libre de bacterias vivas y expulsando por el ano, aquellas que tenía alojadas en su interior.

La depuración clásica de los moluscos es pues un proceso mecánico que realiza el propio animal, limitándose el depurador a suministrarle el agua "limpia". Mediante los debidos controles y análisis que se efectúan en los laboratorios de toda depuradora, se comprueba que los niveles de gérmenes en los moluscos descienden por debajo de los valores considerados perjudiciales para la salud humana, hasta conseguir su aptitud para el consumo.

De todo lo anterior se deduce que lo esencial en una depuradora consiste en:

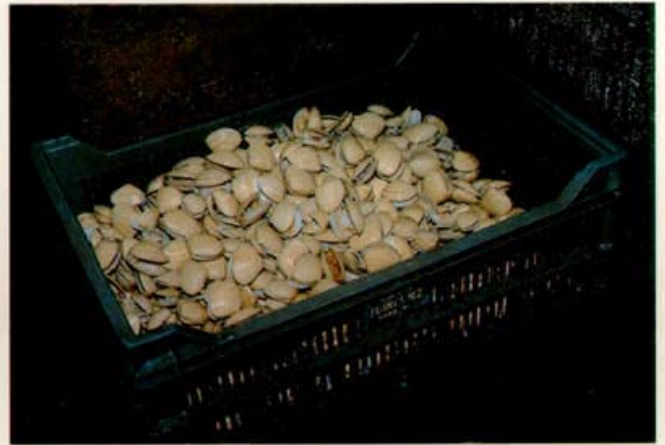
1) Disponer de agua suficiente de cierta calidad y que se pueda depurar por el medio más eficaz y económico posible.

2) Depurar el agua mediante un agente depurador o esterilizador que debe ser eliminado antes de pasar el agua depurada o esterilizada a las piscinas de depuración en las que se encuentran los moluscos.

3) Que los parámetros físico-químicos (temperatura, salinidad, etc) del agua depurada sean lo más parecido posible a los de la naturaleza para que no impidan las actividades fisiológicas de los bivalvos y, entre ellas, la filtración ya que de ella depende, en definitiva, que la depuración se lleve a cabo.

4) Un sistema de análisis y control de la concentración de gérmenes patógenos en los moluscos y el agua.

Conviene destacar que las Estaciones Depuradoras no eliminan absolutamente todos los agentes patógenos, limitándose a actuar sobre las bacterias más importantes y, con toda probabilidad, sobre los hongos, pero no (o en muy escasa medida) sobre los virus, que requieren otro tipo de tratamientos y prevenciones, o sobre las toxiinfecciones por mareas rojas, para las que la legislación y la administración sanitaria prevén actuaciones absolutamente diferentes (cierres temporales y zonales de la venta, control del nivel de dinoflagelados tóxicos en el mar, etc). Tampoco actúa sobre la posible contaminación química del agua y la acumulación de sustancias tóxicas de este origen en el molusco.



***En teoría, los moluscos procedentes de aguas limpias, no contaminadas, no necesitarían ser depurados. Sin embargo, por precaución, la norma se amplía a todos los que pueden ser consumidos en crudo o tras ligera cocción.***



## Actividades

### Autoevaluación

- 1** En la siguiente relación de frases, señalar cuales son verdaderas y cuales falsas:
- En las estaciones depuradoras se eliminan todos los microorganismos que puede albergar un molusco.
  - El agua empleada por las depuradoras para conseguir la depuración de los moluscos es estéril.
  - La depuración es un proceso mecánico que realiza el propio molusco.
  - Una depuradora que tomara agua oceánica no necesitaría esterilizar el agua.
- 2** Relacionar y diferenciar las parejas de conceptos que se señalan:
- Depuración del agua - Esterilización del agua
  - Depuración del agua - Depuración de los moluscos
  - Infección de origen alimentario - Toxinfeción alimentaria
  - Aguas residuales urbanas - Aguas fecales

### Aplicaciones

- 1** Citar algunos ejemplos de alimentos que se consuman crudos o ligeramente cocidos.
- 2** El control o eliminación de gérmenes patógenos en alimentos destinados al consumo en crudo está relativamente extendido. Citar la técnica empleada en cada uno de los casos:

| MOLUSCOS       | DEPURACION |
|----------------|------------|
| AGUA CORRIENTE |            |
| LECHE          |            |
| JAMON          |            |

### Conoce tu entorno

- 1** Buscar el plano de un pueblo o ciudad litoral o situada a pie de río. Subdividir en el plano la línea costera en tramos de unos 100 metros, abarcando unos 2 kilómetros y numéralos. Recorrer la costa o ribera fluvial marcada en el plano. Observar lo que se encuentra en cada tramo de 100 mts y anotarlo en el cuaderno ( A = Presencia: SI/NO, B = Número encontrado: 1,2,3... MUCHO y C = Localización en el plano: Tramo nº 1,2,3...), respecto de los siguientes hechos:

| HECHOS   | A | B | C |
|--|---|---|---|
| Vertidos de aguas fecales depurados                            |   |   |   |
| Vertido de aguas fecales no depurado                           |   |   |   |
| Vertido de aguas industriales                                  |   |   |   |
| Vertido de aguas agrícolas                                     |   |   |   |
| Acumulación sedimentos de origen orgánico en la costa o ribera |   |   |   |

- 2** Preparar unos flotadores de poca altura (a fin de que no les afecte el viento) de varios colores, p. ej., tablillas de madera pintadas con colores vivos. Colocarlos en la salida de cada vertido y seguirlos marcando en el plano la trayectoria, así como el tiempo que tardan en pasar a los tramos siguientes.
- 3** Con 4 botellas de 1 litro o 3/4 de litro de cristal transparente recoger agua de los vertidos en los que se observe acumulación de sedimentos de origen orgánico en sus cercanías. Tapar la botella. Sacudirla con fuerza, mezclando toda la materia suspendida. Colocarla sobre una superficie y dejarla reposar, anotando el tiempo que tarda en depositarse cada fracción (según el tamaño y peso de las partículas). Con las medidas obtenidas en las 4 observaciones, hallar la media de tiempo que tarda en formarse cada fracción del sedimento.
- 4** Con los datos obtenidos en los apartados 1, 2 y 3 puede hacerse una idea groseramente aproximada de la dispersión física de la contaminación en la población estudiada.



# 2

## Microbiología de las aguas marinas en relación a las toxiinfecciones alimentarias por consumo de moluscos

Es conocido que en todas las aguas, sean continentales o marinas, existen microorganismos; pero no todos los microorganismos se encuentran en todas las aguas. De hecho, la composición de las comunidades biológicas y de la microflora, depende, casi absolutamente, de las condiciones físico-químicas del agua.

Contra lo que generalmente se supone, en el agua del mar están presentes una enorme cantidad de microorganismos. Tanto el número de individuos, como la diversidad de especies y formas es prácticamente incalculable, si bien la biomasa total, sólo en determinadas ocasiones y lugares alcanza cifras verdaderamente altas.

Para el estudio de los microorganismos marinos, capaces de provocar toxiinfecciones alimentarias por consumo de moluscos, los subdividiremos en los siguientes grandes grupos:

1. Virus
2. Bacterias
3. Cianofíceas
4. Fitoplancton portador de toxinas
5. Hongos
6. Microfauna: Zooplancton

### Contenido

#### 1. Virus

#### 2. Bacterias

- 2.1. Características generales
- 2.2. Características de las bacterias marinas
- 2.3. Distribución

#### 3. Cianofíceas

#### 4. Fitoplancton, portador de toxinas

#### 5. Hongos

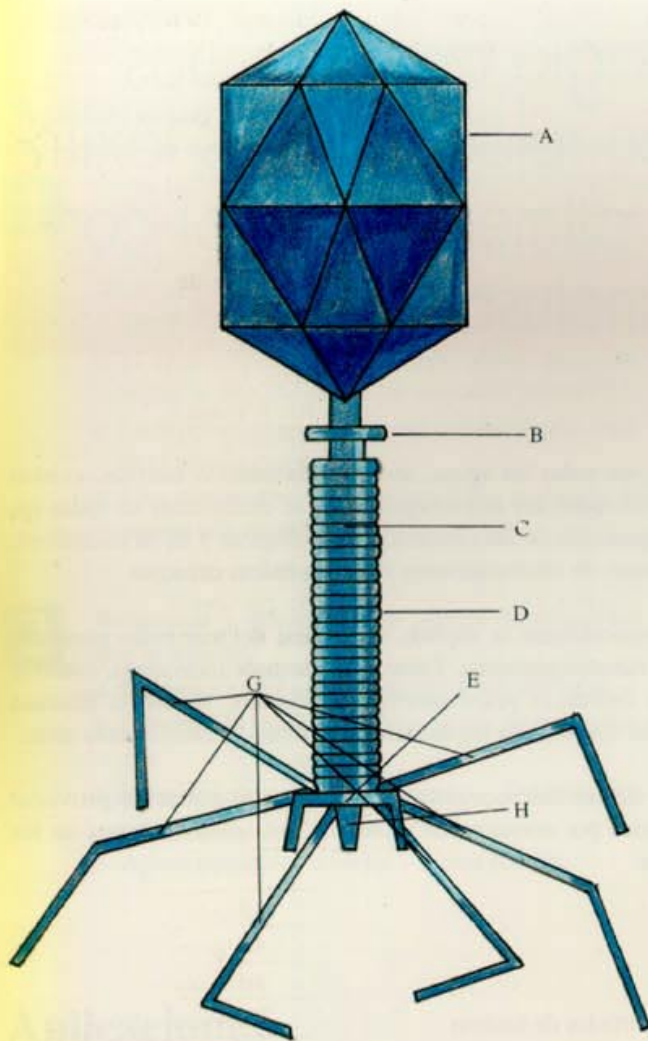
#### 6. Microfauna

### Grupo de organismos, número y biomasa en los sedimentos marinos

(Valores medios de distintos grupos de organismos y su biomasa correspondiente, peso de materia fresca, por metro cuadrado de lodo marino en la capa superior de 5mm de espesor, según ZO BELL, 1963)

| Grupo de Organismos | Número          | Biomasa |
|---------------------|-----------------|---------|
| Bacterias           | 355.000.000.000 | 0,07 g  |
| Diatomeas           | 590.000.000     | 0,06 g  |
| Protozoos           | 283.000.000     | 0,02 g  |
| Meiobentos          | 146.000         | 1,15 g  |
| Pequeño macrobentos | 230             | 3,30 g  |
| Gran macrobentos    | 2,8             | 3,75 g  |





**Ilustración de la estructura de un virus bacteriófago. A.** Cabeza. **B.** Cuello. **C.** Cola. **D.** Vaina. **E.** Placa basal. **G.** Fibras caudales. **H.** Espinas basales.

## 1 VIRUS

Los virus no son organismos independientes, ya que necesitan de células vivas para reproducirse y desarrollarse. Su tamaño es tan reducido (entre 15 y 100 milimicras), que les permite atravesar la membranas bacterianas y, por supuesto, las de las algas unicelulares o las celulares de animales y algas superiores.

Los virus se pueden clasificar según varios criterios. Uno de ellos es atendiendo al organismo que parasitan:

- A. Virus vegetales, que parasitan células de tejidos vegetales
- B. Virus animales, que parasitan tejidos animales
- C. Bacteriófagos (o simplemente, fagos), que parasitan las bacterias.

No se puede establecer diferencia alguna entre los virus marinos y los de agua dulce, ya que su diversidad

tiene más que ver con el organismo que los hospeda (peces, crustáceos, moluscos, etc) que con cualquier otro elemento.

## 2 BACTERIAS EN EL MAR

### 2.1. CARACTERISTICAS GENERALES DE LAS BACTERIAS

Son organismos unicelulares, sin núcleo diferenciado y, a menudo, sin clorofila (bacterias heterótrofas), aunque también son muy abundantes las que poseen éste y otros pigmentos (bacterias autótrofas). Su importancia ecológica, tanto en el mar como en la tierra, es decisiva en muchos aspectos: destrucción y mineralización de la materia orgánica, incluso elaboración de materia orgánica, sobre todo a través de los ciclos del carbono, nitrógeno y azufre y participación como elementos indispensables, en la cadena alimenticia.

### Las bacterias como alimento para los seres marinos

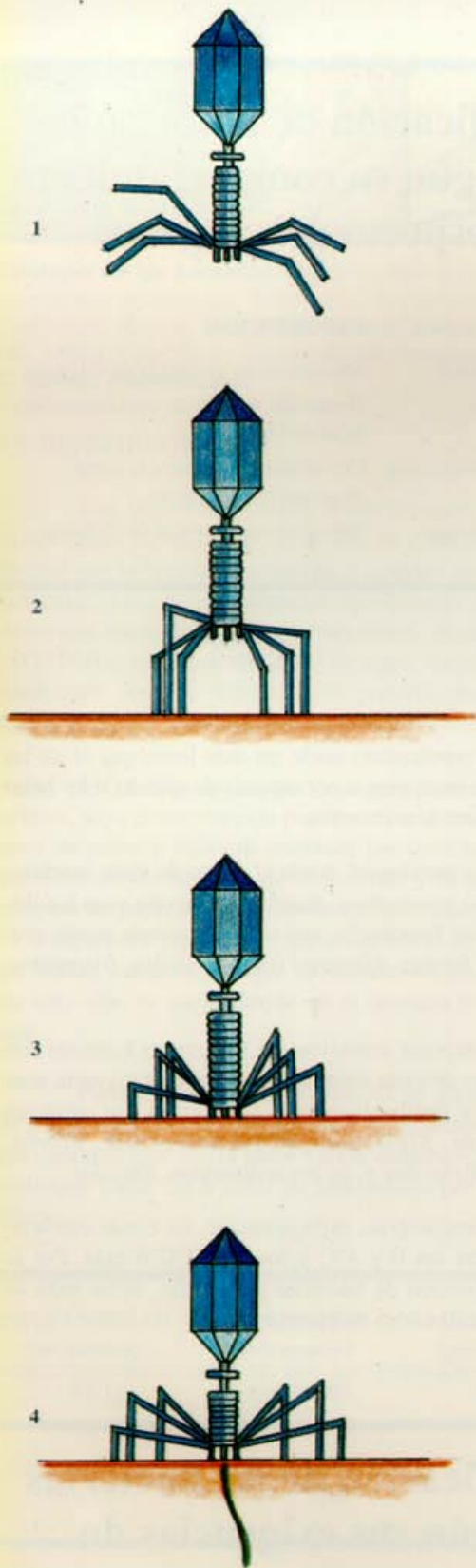
Según Gerhard Rheinheimer, "hay un gran número de seres vivos que se alimentan de microorganismos, tanto en las aguas como en los sedimentos. Algunos de ellos pueden vivir incluso de bacterias u hongos exclusivamente, ya que éstos representan un alimento de gran valor proteico".

Podemos afirmar que la mayoría de los protozoos marinos se alimentan de bacterias, incluso con dietas exclusivamente de bacterias.

Los animales filtradores también pueden alimentarse de bacterias y hongos, siendo estos microorganismos elementos más o menos constantes en su dieta. Así sucede con las esponjas, los corales e, incluso, con los mejillones y ostras, como se ha demostrado para el caso de bivalvos de la costa californiana, capaces de alimentarse con una dieta pura de bacterias, aumentando de peso y tamaño. Sin embargo, también se ha demostrado que no todos los microorganismos son digeridos y aceptados por los moluscos; algunos, después de permanecer durante varias horas en el tracto digestivo, son expulsados.

También los copépodos marinos y larvas de numerosos crustáceos han podido ser alimentados, experimentalmente, con dietas exclusivas de bacterias, sin que mostraran diferencias apreciables en su desarrollo respecto de aquellos que habían sido alimentados con dietas mixtas de moluscos y pescado.





**Inoculación del ácido nucleico de un virus bacteriófago en una bacteria.**

1. Aproximación a la célula. 2. Colocación sobre la superficie bacteriana. 3. Contracción. 4. Inoculación.

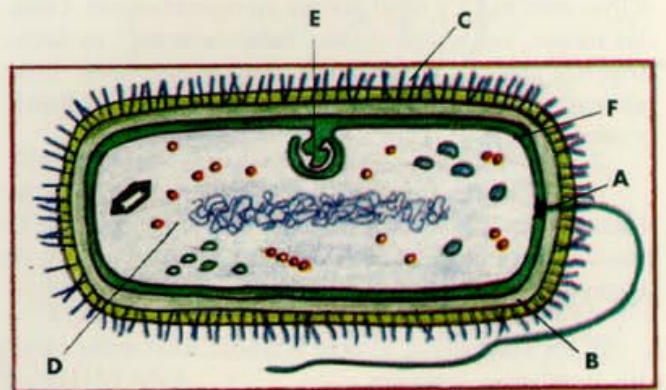
De dimensiones reducidísimas, incluso menores de una micra, su forma es muy variable.

El microscopio de luz muestra dos formas principales de eubacterias: los organismos más o menos esféricos llamados cocos y los de forma cilíndrica, denominados bacilos.

Los cocos pueden presentarse de distinta forma según los planos en que se dividan: si predominan en forma de pares se llaman diplococos; en cadenas, estreptococos y en racimos estafilococos. Los cocos que permanecen adheridos después de una separación sucesiva en dos o tres direcciones perpendiculares, dan lugar a tétradas cuadradas o aglomeraciones cúbicas, llamadas sarcinas.

Cuando los bacilos son extremadamente cortos se denominan cocobacilos; cuando presentan sus extremos más delgados, bacilos fusiformes; si crecen en forma de fibras, filamentosos y cuando lo hacen en formas curvas, vibriones o espirilos.

| MORFOLOGIA          |               | CARACTERISTICAS                                  |
|---------------------|---------------|--|
| COCOS<br>Redondeado | MICROCOCOS    | Aislados o masas irregulares                     |
|                     | DIPLOCOCOS    | Unidos dos a dos                                 |
|                     | ESTREPTOCOCOS | Agrupados en rosario                             |
|                     | ESTAFILOCOCOS | Agrupados en racimos                             |
|                     | SARCINAS      | Aglomeraciones cúbicas                           |
| BACILOS             | COCOBACILOS   | Extremadamente cortos                            |
|                     | FUSIFORMES    | Extremos afilados                                |
|                     | FILAMENTOSOS  | En forma de fibra                                |
|                     | ESPIRILOS     | Rígidos. Una más vueltas de espira               |
|                     | VIBRIOS       | Cortos. Forma de coma. Menos de vuelta de espira |



**Representación esquemática de la estructura de una bacteria.**

A. Pared celular. B. Membrana citoplasmática. C. Cilias. D. Substancia nuclear. E. Mesosoma. F. Cápsula.



Sin embargo hay que tener en cuenta que, una misma bacteria puede mostrar distintas formas (morfología) según la influencia de factores ambientales, por lo que en los estudios bacterianos se incluyen además de la forma, el tamaño, la tinción, movilidad, presencia de flagelos, cápsula y la morfología de las colonias, es decir, la asociación de bacterias que crecen al mismo tiempo y en el mismo sitio, bajo las mismas condiciones.

Las bacterias se dividen generalmente mediante una fisión binaria, la cual da lugar a dos células hijas del mismo tamaño. Algunos bacilos dejan de dividirse en determinadas circunstancias y en su lugar experimentan un complejo proceso de diferenciación que los conduce a la formación de esporas deshidratadas muy resistentes.

Hace ya bastante tiempo se demostró la existencia de la reproducción sexual en los hongos como una alternativa a la reproducción clonal pero respecto de las bacterias se seguía asegurando que solamente se reproducían clonalmente. Sin embargo, los estudios actuales confirman la existencia de reproducción no clonal, por conjugación y recombinación genética, aunque con una frecuencia mucho más baja.

La mayoría de las bacterias tienen una capacidad limitada para resistir condiciones ambientales adversas formando esporas, esto es, células que, al igual que las semillas de las plantas superiores o los quistes de los protozoos, se hallan en un estado de criptobiosis (vida latente) sin ninguna actividad biológica. Estas esporas muestran un manifiesto incremento al efecto letal del calor, desecación, congelación, alteraciones químicas e irradiación.

## 2.2. CARACTERISTICAS DE LAS BACTERIAS MARINAS

- Como es lógico, la mayoría de las bacterias marinas son organismos debilmente halófilos, es decir, necesitan que su medio ambiente tenga una proporción idónea de ClNa, entre el 25 y el 40 por mil aproximadamente. Otras, las menos, son simplemente "halotolerantes", es decir, soportan cambios de salinidad relativamente altos. Estas últimas, son más frecuentes en las zonas de estuario, bahías y proximidades de la costa.

- La gran mayoría, entre el 80 y el 95%, de las bacterias marinas son Gram-negativas, al contrario de lo que sucede en tierra, donde se estima de un 65 a un 75% de Gram-positivas.

- También en su gran mayoría, son formas móviles, flageladas.

- Casi todas son microorganismos anaerobios facultativos, aunque generalmente, se desarrollan mejor en medios con oxígeno que en aguas sin él o con escasa presencia. Muy pocas son anaerobias estrictas.

## Clasificación de los organismos según su comportamiento respecto del oxígeno

| NOMBRE                  | DESCRIPCION   |
|-------------------------|---|
| Aerobios estrictos      | Sólo crecen en presencia de Oxígeno                   |
| Microaerófilos          | Desarrollo óptimo en concentraciones bajas de Oxígeno |
| Anaerobios facultativos | Crece tanto en presencia como en ausencia de Oxígeno  |
| Anaerobios estrictos    | Sólo viven en ausencia de Oxígeno                     |

- Su crecimiento suele ser más lento que el de las bacterias terrestres, pese a ser capaces de utilizar muy bajas concentraciones de nutrientes.

- No constituyen, desde el punto de vista morfológico, un grupo homogéneo, aunque la mayoría sean bacilos flagelados. Con frecuencia, una misma bacteria puede presentarse bajo formas diferentes (cocos, bacilos, filamentos, etc).

- Tampoco constituyen un grupo homogéneo desde el punto de vista sistemático, aunque la mayoría sean eubacterias y particularmente frecuentes los géneros *Pseudomonas*, *Spirillum*, *Flavobacterium*, *Vibrio*, *Alcaligenes*, *Beneckea* y, en los sedimentos, *Bacillus*.

- Se encuentran, especialmente, en zonas con temperaturas entre los 0 y 4°C y los 18-22°C o más. Por lo tanto, la proporción de bacterias psicrófilas, sobre todo de psicrófilas facultativas, es bastante alta.

## Clasificación de las bacterias según sus exigencias de temperatura

| GRUPO       | MINIMO      | OPTIMO      | MAXIMO       |
|-------------|-------------|-------------|--------------|
| Psicrófilas | -10 a +5°C  | +10 a +20°C | +13 a 25°C   |
| Mesófilas   | +10 a +15°C | +25 a +40°C | +30 a 50°C   |
| Termófilas  | +25 a 45°C  | +50 a +75°C | +75 a +100°C |





**Tipología de las bacterias.** **A.** Formas redondeadas en bastón y esporaceas: *Micrococcos*, *Diplococcos*, *Streptococcos*, *Bacilos*, *Estafilococcos*, *Plétridos*, *Clóstridos*. **B.** Formas curvas y en espiral. *Vibrión*, *Cefalciforme*, *Espirilo*, *Borrelia*, *Treponema*, *Leptospira*. **C.** Formas filamentosas.

### 2.3. DISTRIBUCION

Las bacterias marinas se encuentran, sobre todo, en las aguas superficiales, entre los 10 y los 50 metros, si bien no son infrecuentes a medias y grandes profundidades, particularmente en el sedimento. Su número y concentración varía enormemente según las zonas, desde 100.000 a 1.000.000 o más por mililitro de agua, dependiendo de numerosos factores: temperatura, presión, densidad, presencia de nutrientes, dinámica marina, etc.

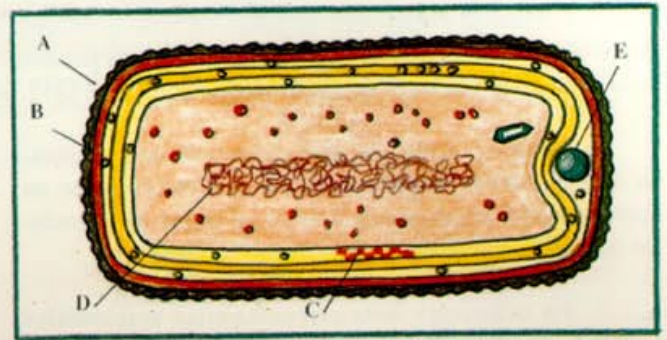
En el caso de las bacterias presentes en los sedimentos, cuya concentración puede oscilar entre unos centenares de miles y miles de millones por centímetro cúbico, dependiendo de la clase de sedimento y la profundidad, cumplen un papel importantísimo en la remineralización de los compuestos orgánicos y en la nutrición de la fauna de los fondos marinos. Aunque su número en los sedimentos sea muy alto, su participación en la biomasa total suele ser baja.

Particularmente interesante, es su gran número en las playas arenosas, ya que incluso en la arena limpia hay una cantidad que oscila entre varios centenares de miles y millones, hasta 20 o más, de individuos por centímetro cúbico.

| PROFUNDIDAD<br>(en metros) | B. AEROBIAS<br>(por gramo) | B. ANAEROBIAS<br>(por gramo) |
|----------------------------|----------------------------|------------------------------|
| 0 a 10                     | 62.000.000                 | 8.900.000                    |
| 40 a 50                    | 91.000                     | 23.000                       |
| 240 a 250                  | 2.000                      | 900                          |
| 500 a 510                  | 580                        | 26                           |

## 3 CIANOFICEAS MARINAS

También llamadas algas azules o cianobacterias, las cianofíceas marinas son muy parecidas a las de agua dulce, si bien no parecen desempeñar papeles tan importantes en los fenómenos biológicos, pese a encontrarse (según las zonas) formando parte importante del plancton.

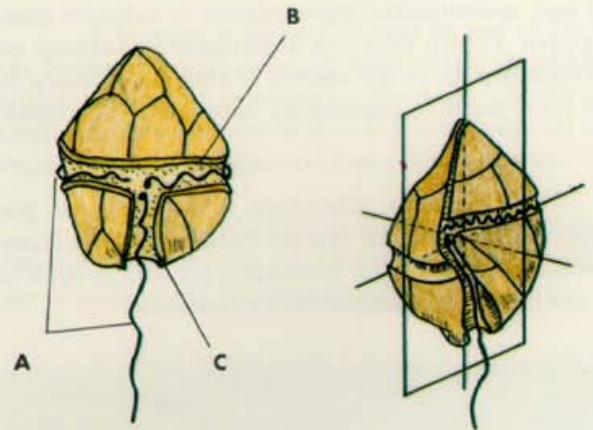


**Representación esquemática de la estructura de una cianofícea.** **A.** Membrana externa. **B.** Membrana plasmática. **C.** Vesículas de gas. **D.** Carboxisoma. **E.** Cianoficina.

Son microorganismos unicelulares que, a menudo, forman filamentos de una sola serie de células, unidas o no por una vaina gelatinosa común, en ocasiones con apariencia de ramificada.

Deben su típico color azul a un pigmento, llamado "ficocianina", al que acompañan otros, entre ellos, la clorofila (verde), caroteno (anaranjado), etc.

Aunque son más abundantes en la tierra y el agua dulce, también son frecuentes en las franjas costeras, tanto en las zonas supra y mediolitoral como infralitoral, viviendo sobre las plantas, las rocas, la arena o el fango costero, donde, en ocasiones, por su extraordinaria abundancia, llegan a colorear el mar, formando "flores de cianofíceas" de decenas de kilómetros de longitud.



**Dinoflagelado.** **A.** Flagelos. **B.** Surco transversal o cingulum. **C.** Surco longitudinal o sulcus.

## 4 FITOPLANCTON, PORTADOR DE TOXINAS SUCEPTIBLES DE PROVOCAR ENFERMEDADES A LA ESPECIE HUMANA

Casi exclusivamente, son algas unicelulares, que pertenecen a la Clase Dinoflageladas, pero que representan uno de los grupos más importantes y numerosos de cuantos constituyen el fitoplancton.



Tienen dos flagelos, alojados en sendos surcos más o menos perpendiculares, mediante los cuales pueden tener una relativa independencia de movimientos.

Su única célula, que está rodeada de una membrana de naturaleza, mayoritariamente celulósica, posee un núcleo grande y órganos en los que se alojan los pigmentos (clorofila, carotenos, etc).

En ocasiones, ante circunstancias ambientales adversas, pueden enquistarse. Se reproducen por división directa, de modo que cada mitad resultante de la división de la célula original, reconstruye la otra mitad. Se producen así, dos células hijas.

Algunas especies de este gran grupo, poseen biotoxinas capaces de provocar enfermedades, incluso mortales, a diferentes clases de seres marinos (por ejemplo, peces).

Por otra parte, estas biotoxinas, acumuladas en animales filtradores (para los que son inócuas) objeto de consumo humano, como es el caso de los moluscos, pueden ser tóxicas para el hombre. Son los conocidos efectos de la ingestión de moluscos bivalvos marinos, afectados por la presencia de "Mareas Rojas tóxicas".

## 5 HONGOS MARINOS

Contra lo que se suponía hasta hace relativamente pocos decenios, los hongos están ampliamente distribuidos en el mar, encontrándose representantes de todos los grandes grupos. Pueden tener una importancia fundamental en la biología marina, ya que muchos de ellos son parásitos de seres vivos marinos, causándoles importantes enfermedades.

Se concentran, sobre todo, en la costa. Así, por ejemplo, en las costas del Mar del Norte y Atlántico Norte se encontraron hasta 2.000 ficomicetos por litro de agua, si bien con importantes fluctuaciones estacionales.



*Las enfermedades provocadas por el zooplancton o los parásitos protozoarios de moluscos son poco frecuentes y raramente comentadas.*

Se ha demostrado su presencia en numerosos sedimentos, tanto de lodos como de arena, a diferentes profundidades. Así, por ejemplo, en la capa superficial de lodos del Atlántico Norte (0 a 10 mm) se han encontrado de 1.000 a 10.000 hongos inferiores por litro de sedimento.



*El zooplancton está escasamente representado en las infecciones alimentarias por consumo de moluscos.*

## 6 MICROFAUNA: ZOOPLANCTON

En el capítulo de las toxiinfecciones alimentarias por consumo de moluscos, el zooplancton apenas repercute. Sin embargo, en el caso del consumo en crudo de moluscos bivalvos cosechados en aguas cercanas a vertidos industriales, los animales pueden albergar organismos parasitarios (protozoos e incluso metazoos) que, para el hombre, son perjudiciales. En este caso, el molusco haría el papel de huésped intermedio en el ciclo de un parásito humano. Sin embargo, este hecho, además de poco frecuente, apenas está recogido en la literatura médica.



## Actividades

### Práctica I: CONTAJE DE COLONIAS PRESENTES EN EL AGUA DE MAR

#### Material:

Agitador de vidrio o magnético  
Autoclave  
Lámpara de iluminación fluorescente  
Mechero  
Microscopio estereoscópico  
Nevera  
pHmetro  
Placa calefactora  
Frascos de vidrio neutro de 250 o 500 ml, con tapón esmerilado  
Papel de aluminio o papel opaco.  
Pinzas  
Placas Petri  
Varilla de vidrio  
Vaso de precipitado de 1 l  
Agua de mar  
Acido clorhídrico  
Agar  
Cloruro sódico  
Extracto de levadura  
Hidróxido sódico  
Peptona

#### Observaciones:

Esta práctica ha de realizarse en el laboratorio a las pocas horas de haber recogido la muestra del agua marina, con los cuidados expuestos en el texto.

La duración de la práctica es la siguiente: 3 días para envejecer el agua de mar, 2 días para preparar las placas con el medio de cultivo y 2 días más para recojerlas y observarlas.

#### Método:

1. Preparar el medio de cultivo MARIM AGAR sobre placas Petri. Para ello:

a) Envejecer 1 litro de agua de mar, colocándola en un lugar oscuro y el frasco envuelto en papel opaco durante 3 días.

b) Pesar las cantidades que se indican de las diferentes sustancias:

|                           |         |
|---------------------------|---------|
| Peptona.....              | 5,00 g  |
| Extracto de levadura..... | 1,00 g  |
| Cloruro sódico .....      | 34,25 g |
| Agar.....                 | 15,00 g |

c) Verter el agua de mar envejecida sobre un vaso de precipitado y colocarlo en una placa calefactora. Añadir las sustancias, en las cantidades indicadas, procurando agitar hasta conseguir la mayor homogeneidad posible de la mezcla.

d) Ajustar al pH hasta conseguir  $7,6 \pm 0,2$  a  $25^\circ\text{C}$ , ya sea añadiendo el ácido clorhídrico o el hidróxido sódico.

e) Calentar hasta la ebullición de la mezcla y, acto seguido, esterilizar en el autoclave a  $120^\circ\text{C}$  durante 30 minutos.

f) Sacar las placas esterilizadas y dejarlas, durante unas 24 horas, boca abajo hasta que solidifiquen.

g) Colocar las placas en la nevera hasta el momento de su uso.

2. Recoger la muestra de agua de mar en los frascos limpios y esterilizados, en zona alejada de paredes u orillas, procurando introducirlos invertidos y sumergirlos totalmente para llenarlos dándole la vuelta dentro del agua. Precintar, rotular y etiquetar el frasco con la muestra.

3. Sacar las placas de la nevera y dejarlas a temperatura ambiente durante 3 o 4 horas. Esterilizar las pipetas que se vayan a usar, así como las varillas de vidrio.

4. Antes de que pasen 6 horas de la recogida de la muestra (si se prevé que pudiera sobrepasarse ese tope, habría que, una vez recogida la muestra, refrigerarla y mantenerla a unos  $4^\circ\text{C}$ ), se coge con la pipeta (previamente esterilizada) una muestra de agua de 0,1 ml y se extiende por la placa mediante la varilla de vidrio, también esterilizada. (NOTA: Se deben hacer, por lo menos, 2 extensiones por muestra de agua).

5. Introducir las placas en la estufa de cultivo, regulando la temperatura a  $25^\circ\text{C}$ . Dejarlas en la estufa durante uno o dos días.

6. Sacar las placas de la estufa y contar las colonias existentes, ayudándose si es preciso del microscopio estereoscópico y una lámpara de iluminación.



## Autoevaluación

- 1** Relacionar las dos series de términos, haciendo corresponder la letra (A,B,C ....) con el número (1,2,3 ...):

|   |              |   |                |  |  |
|---|--------------|---|----------------|--|--|
| A | Cianoficea   | 1 | Sal abundante  |  |  |
| B | Fitoplancton | 2 | Microfauna     |  |  |
| C | Halófila     | 3 | Ficocianina    |  |  |
| D | Zooplancton  | 4 | Medio agresivo |  |  |
| E | Quiste       | 5 | Dinoflagelado  |  |  |

- 2** Definir los siguientes conceptos:

- Marea Roja
- Marea Roja tóxica
- Dinoflagelado
- Microorganismo

- 3** En el cuadro señalar con un signo + (muy abundante), ± (relativamente abundante) o -, la abundancia relativa de los grupos de organismos en los diferentes ambientes:

|                      | AGUAS OCEANICAS | AGUAS LITORALES | SEDIMENTO OCEANICOS | SEDIMENTO LITORAL |
|----------------------|-----------------|-----------------|---------------------|-------------------|
| Virus                |                 |                 |                     |                   |
| Bacterias            |                 |                 |                     |                   |
| Bacterias termófilas |                 |                 |                     |                   |
| Cianofíceas          |                 |                 |                     |                   |
| Hongos               |                 |                 |                     |                   |

## Aplicaciones

- 1** En un libro de edafología investigar el grupo de microorganismos, número (valor medio) y biomasa (valor medio) por metro cuadrado en diversos suelos agrícolas. Compararlo con los datos ofrecidos en este texto sobre su abundancia en el agua y sedimentos marinos.

- 2** En una cartulina grande dibujar a escala los tamaños de un virus, bacterias, cianofíceas, dinoflagelados y larva planctónica de un molusco (ostra, p. ej.), sabiendo que sus tamaños medios oscilan entre:

- Virus: 15 y 100 milimicras.
- Bacterias: Entre 0,1 micras y 400 micras, siendo los más frecuentes tamaños alrededor de 1 micra.
- Cianofíceas: Entre 0,5 micras y 120 micras, siendo los más frecuentes valores intermedios entre ambos extremos.
- Dinoflagelados: Entre 8 micras y 2 milímetros, siendo valores frecuentes entre 50 y 250 micras.
- Larva de ostra: Como valor medio aproximado, puede establecerse en 200 o 250 micras.

- 3** Contra la opinión general, la mayoría de las bacterias son beneficiosas para la especie humana y sólo unas pocas son patógenas. En este sentido, citar algunas especies beneficiosas, así como el beneficio que producen o industria que en ellas se fundamenta de los siguientes grupos:

|              | ESPECIES | BENEFICIO |
|--------------|----------|-----------|
| Saprófitas   |          |           |
| Simbióticas  |          |           |
| Nitrificante |          |           |
| Cimógena     |          |           |

## Conoce tu entorno

- 1** Son numerosas las industrias basadas en la actividad microbiana. Algunas de esas industrias son frecuentes en cualquier pueblo o comarca. Cita las más frecuentes en el entorno, así como la fuente o inóculo de microorganismos que utilizan.

- 2** Con ayuda de la bibliografía adecuada, señalar las especies de microorganismos utilizados en los procesos de fabricación siguientes:

|             | PRODUCTO | ESPECIES |
|-------------|----------|----------|
| Mantequilla |          |          |
| Queso       |          |          |
| Yogurth     |          |          |
| Vinagre     |          |          |
| Vino        |          |          |
| Penicilina  |          |          |



# 3

## Vertidos, microorganismos y enfermedades

En las aguas litorales se vierten, sin depuración previa, gran cantidad de materiales de deshecho, así como las aguas residuales de uso doméstico e industrial, que actúan, alterándola, sobre la microflora y microfauna naturales del medio marino.

Entre esas alteraciones destaca, entre otras, el transporte por las aguas residuales domésticas, de gran número de microorganismos patógenos para el hombre.

### 1 MICROORGANISMOS DE AGUAS RESIDUALES

Las aguas residuales domésticas poseen un importantísimo volumen de microorganismos. Entre esos gérmenes destacan, por su alto porcentaje, las bacterias de la putrefacción, pertenecientes a los géneros *Aerobacter*, *Bacillus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, etc. Sin embargo, aunque su volumen sea significativamente menor, no son menos importantes (por las consecuencias que puede provocar su presencia) las bacterias, hongos y virus patógenas para la especie humana.

Entre esos gérmenes patógenos, cabe destacar, por su relación con nuestro tema, las *Salmonellas*, *Vibrio*, *Shigella* y ciertos virus, así como en general las bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*.

### 2 PERIODO DE SUPERVIVENCIA

Todas estas bacterias, hongos y virus, una vez que son arrastrados al mar, constituyen una población alóctona que tiene un periodo de supervivencia relativamente corto, ya que el agua marina es un potente germicida para las especies no adaptadas a su salinidad.

Ese período de supervivencia es más o menos largo, según diversos factores y circunstancias. Depende, en primer lugar, de la propia especie. Después, de otros factores, tales como la calidad del sedimento, la temperatura del agua, la salinidad, el pH, el volumen y cualidad de la población bacteriana preexistente, la presencia de animales filtradores, etc.

Para cuantificar ese período de supervivencia, se recurre a un parámetro denominado T90 o "tiempo necesario para una reducción del 90% de una población bacteriana". Su valor oscila, normalmente, entre media hora y 20 horas, si bien los virus enteropatógenos procedentes de aguas residuales resisten bastante más.

#### Contenido

##### 1. Microorganismos de aguas residuales

- 1.1. Bacterias, hongos y virus

##### 2. Período de supervivencia

##### 3. Consumo de moluscos y enfermedad

- 3.1. Fiebre tifoidea y paratifoidea. Salmonelosis
- 3.2. Infección por *Vibrio parahaemolyticus*
- 3.3. Cólera por *Vibrio cholerae*
- 3.4. Disentería bacilar
- 3.5. Hepatitis viral del tipo A
- 3.6. Picornavirus



## Supervivencia de virus y bacterias

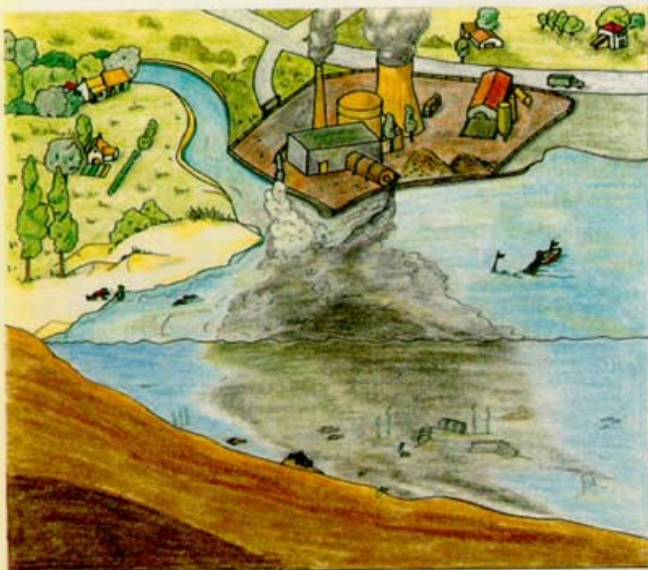
Los gérmenes patógenos procedentes de vertidos son capaces de sobrevivir cierto tiempo en el mar y más aún en el interior de los moluscos.

Ese período de supervivencia varía mucho según las especies y las características físico-químicas del agua que los acoge, así como de la propia concentración natural de bacterias que, al entrar en competencia con las procedentes de vertidos, terminan por desplazarlas.

Así, en el caso de la bacteria *Escherichia coli*, ese período va desde apenas unas horas, en lugares con escaso material nutritivo, hasta algunos días, en zonas de estuario, ricas en alimento.

En el caso del virus de la hepatitis A, el período de supervivencia puede alcanzar hasta dos semanas, si bien, a temperaturas por debajo de los 4 °C, ese tiempo se alarga hasta un mes o más. En el caso de que el virus se encuentre en los sedimentos, entonces todavía hay que multiplicar por cuatro o cinco veces el período en que sobreviven los virus.

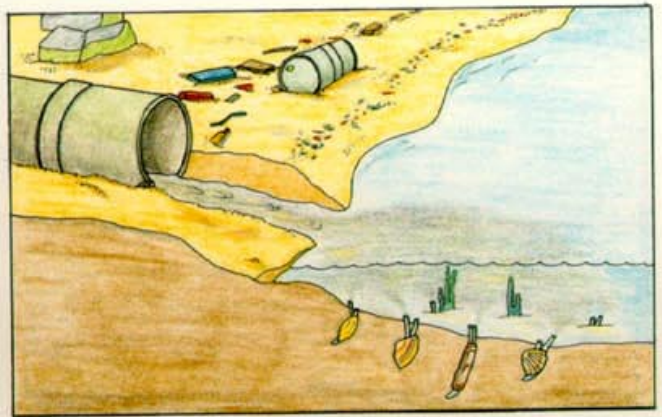
Por añadidura, si en ese período, las bacterias o virus logran alojarse en el interior de un bivalvo, el tiempo de supervivencia aumenta.



En las aguas litorales se vierten, sin depuración previa, gran cantidad de materiales de deshecho.

### 3 CONSUMO DE MOLUSCOS Y ENFERMEDADES

Son relativamente numerosas las enfermedades y trastornos que se relacionan con el consumo de mariscos bivalvos. Destacamos, entre las causadas por microorganismos presentes en los moluscos, las siguientes: 1) Fiebre tifoidea y paratifoidea. Salmonelosis, 2) Diarrea y trastornos abdominales por infección de *Vibrio parahaemolyticus*,



Las aguas residuales domésticas poseen un importantísimo volumen de microorganismos, algunos patógenos, que pueden ser ingeridos por los moluscos.

3) Cólera por *Vibrio cholerae*, 4) Disentería bacilar, 5) Hepatitis viral del tipo A, 6) Otras infecciones víricas, provocadas por *Picornavirus*.

#### 3.1. FIEBRES TIFOIDEA Y PARATIFOIDEA. SALMONELOSIS

Desde antiguo estas enfermedades se asocian al consumo de moluscos crudos procedentes de aguas contaminadas por residuos urbanos. Es suficiente una débil dosis de las bacterias, *Salmonella typhi* o *Salmonella paratyphi*, para contraer la enfermedad. No obstante, parece que sólo los moluscos muy fuertemente contaminados pueden transmitirla. Para prevenirlas son suficientes las técnicas de depuración en agua limpia.

Las salmonelosis están muy extendidas en estuarios y zonas litorales en la proximidad de vertidos domésticos. Pese a ello, se encuentran en escasas proporciones en el interior de los moluscos, pero no deja de ser probable una contaminación externa, incluso posterior a su cosecha por una manipulación en deficientes condiciones higiénicas (por ejemplo, al depositarse en mostradores, cajas, etc. contaminados de *Salmonella*). Una depuración y manipulación posterior adecuadas, son suficientes para eliminar el riesgo de infección.

#### 3.2. INFECCION POR *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS*

Esta bacteria se encuentra naturalmente en el mar y, por tanto, no está asociada a vertidos urbanos, si bien parece que las aguas cercanas a estos desagües tienen una concentración media superior a la habitual en el medio marino.

La simple depuración no parece eliminar completamente el riesgo de infección, siendo más eficaz un estricto control de las instalaciones y utensilios de almacenaje, del tratamiento y manipulación del molusco, así como de la temperatura.

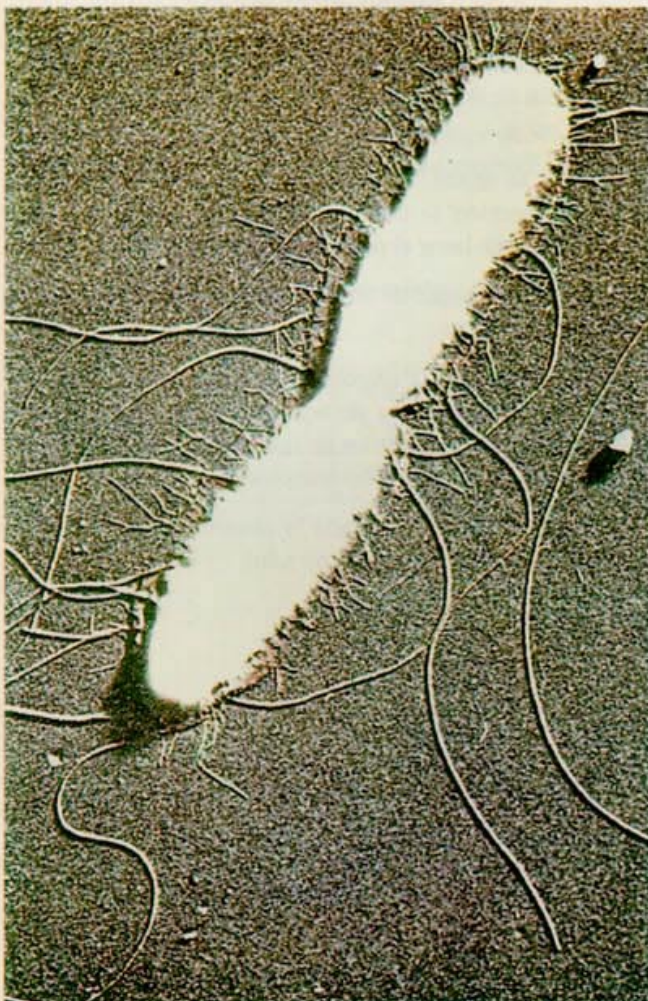


### 3.3. COLERA

Aunque es cada vez más infrecuente en los países industrializados y rarísima en Europa (la última epidemia, provocada por la ingestión de mejillones, tuvo lugar en 1.973 en Nápoles) sigue teniendo importancia en los países en desarrollo. Puede encontrarse en moluscos, procedentes de aguas contaminadas por residuos urbanos o bien, en moluscos contaminados en cualquiera de las fases de manipulación, transporte o almacenaje, ya que, durante las epidemias de cólera, la bacteria causante, el *Vibrio*, puede encontrarse en cualquier lugar con un cierto grado de humedad.

### 3.4. DISENTERIA BACILAR

Es una enfermedad causada en el hombre por bacterias del género *Shigella*, sobre todo por la especie *S. dysenteriae*, que se manifiesta con diarrea, fiebre y dolor abdominal tras un periodo de incubación de 1 a 4 días. Aunque no abundan las citas sobre la transmisión de la enfermedad por consumo de moluscos, siempre es posible la invasión como consecuencia de la ingestión de moluscos cultivados en aguas fuertemente contaminadas o bien por una manipulación en malas condiciones higiénicas durante las labores de pre-venta o en los locales de exposición.



Microfotografía de una *Salmonella*.

### 3.5. HEPATITIS VIRAL DE TIPO A

El consumo de moluscos bivalvos fuertemente contaminados por el virus, ya sea crudos o tras una cocción insuficiente, puede provocar la enfermedad. Los primeros casos atribuidos al consumo de moluscos crudos, se produjeron hace unos cuarenta años en Suecia.

Se asocia a almejas, ostras, etc, procedentes de aguas contaminadas por vertidos domésticos. Hay que tener en cuenta, que este virus es capaz de sobrevivir en el medio marino durante un tiempo bastante largo lo que facilita su expansión a distancias lejanas del foco contaminante.

La mayor epidemia de Hepatitis A relacionada con el consumo de mariscos, se produjo en 1988, que afectó a casi 300.000 consumidores de almejas en Shanghai (China). En la actualidad, se achacan a este origen el 25% de las hepatitis A de Gran Bretaña, Alemania o la costa este de Estados Unidos.

### 3.6. PICORNAVIRUS

Comprenden dos subgrupos: 1) *enterovirus* y 2) *rinovirus*, de los cuales, a los efectos estudiados en este tema, destacan los enterovirus que son un grupo de microorganismos que se encuentran típicamente localizados en el estómago e intestino de los vertebrados, aunque también en los sistemas respiratorio y nervioso, donde provocan diversas enfermedades. Este subgrupo incluye los Poliovirus (3 serotipos), los virus Coxsackie tipo A (23 serotipos) y tipo B (6 serotipos) y los virus ECHO (31 serotipos).

No parecen existir pruebas concluyentes de la transmisión de enterovirus por los moluscos, aunque el virus se haya encontrado en bivalvos cosechados en aguas cercanas a los desagües de aguas fecales.

Dada su gravedad (entre otras enfermedades provocadas por enterovirus se encuentra la poliomielitis, provocada por Poliovirus) y tras la comprobación de que muchos moluscos bivalvos (almejas, mejillones, ostras...) son capaces de concentrar los enterovirus que pueda haber en las aguas, deben extremarse los cuidados y prevenir la venta de moluscos procedentes de zonas donde se haya detectado el virus.



Bacilos.



## Actividades

### Práctica I: TINCION GRAM

Dada el escaso contraste entre las bacterias y el medio que las rodea, el modo más sencillo de observarlas al microscopio es mediante el empleo de colorantes. Uno de los métodos más conocidos y empleados de tinción diferencial (método que no tiñe del mismo modo a todas las células) de bacterias, es el denominado Tinción Gram, que da lugar a una importante clasificación de las bacterias en Gram+ y Gram-, según que las células queden al final de la técnica teñidas de violeta o no.

#### Material:

- Microscopio
- Portaobjetos
- Papel de filtro
- Mechero
- Asa de siembra
- Cuentagotas
- Pinzas
- Frasco lavador
- Agua destilada
- Agua corriente
- Alcohol
- Cristal de violeta de Hucker
- Xilol
- Lugol
- Alcohol de 95°
- Safranina
- Aceite de cedro
- Placa de cultivo con las bacterias problema

#### Condiciones:

La práctica debe realizarse en el laboratorio con sumo cuidado y limpieza. Es preciso tener en cuenta el posible carácter patógeno de las bacterias problema, por lo que han de extremarse los cuidados caso de ser alumnos los que realicen la práctica, recomendándose, en este caso, que el profesor elija previamente las bacterias a estudiar.

#### Método:

1. Se elige un porta esteril y bien limpio, para lo cual después de esterilizado se lava con alcohol, se seca con papel de filtro y se flamea a la llama del mechero.
2. Sobre el porta se coloca una gota de agua destilada.
3. Se esteriliza, a la llama del mechero, el asa de siembra y, con ella se recoge una reducida cantidad de suspensión o una de colonia de las bacterias problema. Las bacterias se depositan en la gota de agua del portaobjetos y, con el mismo asa, se extiende la gota sobre el porta.
4. Se fija la extensión por calor, para lo cual se procede a calentar suavemente el porta por su parte inferior a la llama del mechero hasta que se seque.
5. Se añade el colorante inicial (cristal violeta de Hucker) y se le deja actuar durante 1 minuto. Pasado este tiempo se procede a lavar el porta suavemente con agua destilada.
6. Se añade, como mordiente, lugol que también se deja actuar durante otro minuto, pasado el cual se decolora con alcohol de 95° y, acto seguido, se lava con agua destilada.
7. Se añade, como colorante de contraste, la safranina que también se deja actuar durante un minuto para inmediatamente lavar el porta con agua corriente.
8. Con papel de filtro, sin frotar y suavemente, se seca el portaobjetos.
9. Una vez la preparación completamente seca, se añade una gota pequeña de aceite de cedro y observa al microscopio con el objetivo de inmersión, enfocando, preferentemente, con el tornillo micrométrico.
10. Una vez realizada la observación, el objetivo de inmersión debe limpiarse con xilol.



## Autoevaluación

**1** Encontrar los términos que corresponden a las siguientes definiciones:

- Tiempo necesario para una reducción del 90% de una población bacteriana.
- Enfermedad o trastorno causada por una Salmonela.
- Eliminación de todos los gérmenes y sus posibles quistes.
- Aguas con productos o bajo la influencia de productos de la excreción de animales.

**2** Señalar en el cuadro, con los signos + (inevitable), ± (estrecha) y - (poca o ninguna), la relación que pueda haber entre los siguientes hechos:

|  | + | ± | - |
|--|---|---|---|
| Gran población - Contaminación de Rías |   |   |   |
| Zona industrial - Contaminación fecal  |   |   |   |
| Zona urbana - Contaminación fecal      |   |   |   |
| Zona urbana - Contaminación química    |   |   |   |
| Rios y estuarios - Contaminación       |   |   |   |

**3** Explicar brevemente la respuesta que se ha dado en el cuestionario anterior, a los apartados 3 y 5.

**4** Relacionar los agentes etiológicos con las enfermedades:

|   |              |   |            |  |  |
|---|--------------|---|------------|--|--|
| A | Salmonelosis | 1 | Virus A    |  |  |
| B | Cólera       | 2 | Vibrio     |  |  |
| C | Hepatitis    | 3 | Salmonella |  |  |

## Aplicaciones

**1** Cuando se produce una infección el organismo reacciona. Con ayuda de los textos especializados investigar los mecanismos de defensa fundamentales del organismo humano frente a las invasiones de gérmenes patógenos.

**2** A menudo es necesario ayudar al organismo para defenderse del posible daño de los gérmenes patógenos, ya sea con medidas preventivas o no. Entre estas medidas cabe destacar: vacunación, sueroterapia, aplicación de sulfamidas, antibióticos, etc. Distinguir y definir brevemente cada uno de estos conceptos.

**3** Señalar el grupo de organismos, así como las especies de donde se extraen los antibióticos citados:

| Penicilina       | Hongos | gen. Penicillum |
|------------------|--------|-----------------|
| Estreptomomicina |        |                 |
| Cloranfenicol    |        |                 |
| Aureomicina      |        |                 |
| Tirotricina      |        |                 |
| Terramicina      |        |                 |
| Neomicina        |        |                 |

## Conoce tu entorno

**1** En acuicultura, tanto de moluscos y crustáceos como de peces, se emplean con relativa frecuencia antibióticos. Con ayuda de la bibliografía adecuada, citar cuáles de ellos son más empleados y bajo que circunstancias.

**2** Hay una serie de vacunas de aplicación obligatoria, tanto en lo que se refiere a la especie humana como a los animales domésticos. ¿Cuáles? Investigarlo.

| ESPECIE         | VACUNA DE APLICACION OBLIGATORIA |
|-----------------|----------------------------------|
| Hombre          |                                  |
| Perro           |                                  |
| Ganado porcino  |                                  |
| Ganado caballar |                                  |

**3** Describir las principales enfermedades citadas en el texto.



# 4

## Anatomía y fisiología de moluscos en relación a la ingestión de alimento

Los microorganismos contaminantes, en su mayor parte bacterias, se encuentran en la superficie exterior del molusco así como recubriendo la superficie de los tejidos del mismo, tanto los exteriores como los de la cavidad paleal. También recubren las branquias el interior del tracto digestivo.

Si la depuración, como hemos visto, consiste en la eliminación de estos microorganismos contaminantes del cuerpo del molusco, ha de cumplir dos requisitos:

a) eliminar los microorganismos que se encuentren en la superficie exterior del cuerpo, así como recubriendo los tejidos externos.

b) eliminar los microorganismos patógenos internos, fundamentalmente, los presentes en el aparato digestivo.

Mientras la primera de las tareas, corresponde realizarla al depurador (por limpieza externa del molusco), la segunda la realiza el propio animal por filtración mecánica, bajo condiciones adecuadas.

Los moluscos bivalvos, que se alimentan por filtración del agua de mar, concentran activamente los microorganismos que puedan encontrarse en las aguas que "beben". De aquí que pueda afirmarse que la calidad sanitaria de los moluscos recién cosechados es, concentrada, la del agua en la que viven.

Una ostra adulta, por ejemplo, filtra cada día unos 90 a 100 litros de agua de mar, de manera que la concentración de microorganismos en su intestino es sensiblemente mayor que la del medio. En el caso del mejillón, un individuo adulto, puede filtrar entre 50 y 120 o más litros de agua de mar diarios, reteniendo el 90% de los microorganismos que ésta contiene.

Por el contrario, los bivalvos que se encuentran en agua exenta de gérmenes patógenos, por el mismo mecanismo de la filtración, irán "limpiándose" de modo que la concentración de patógenos en el molusco tenderá al equilibrio con la concentración de los mismos en el agua. Este punto de equilibrio, fuertemente condicionado por la temperatura, se alcanza con relativa rapidez, en unas pocas horas.

### 1 LA FILTRACION Y LA ALIMENTACION

La filtración en los moluscos está íntimamente relacionada con las funciones de respiración y digestión, así como con los factores externos que afectan la fisiología del sistema branquial y del aparato digestivo, tales como la temperatura, salinidad, calidad del agua, etc.

#### 1.1. ANATOMIA DE LA FILTRACION Y RETENCION DE PARTICULAS

En los procesos de la filtración y alimentación intervienen, directamente, los sifones, las branquias y el aparato digestivo de los moluscos.

### Contenido

#### 1. Filtración y alimentación

- 1.1. Anatomía de la filtración y alimentación
  - 1.1.1. Los sifones
  - 1.1.2. Las branquias
  - 1.1.3. El aparato digestivo
- 1.2. Mecanismos de filtración y retención de partículas
  - 1.2.1. La circulación del agua
  - 1.2.2. De las branquias a la boca
- 1.2.3. En el aparato digestivo

#### 2. Filtración, alimentación y concentración bacteriana

- 2.1. Influencia de la temperatura
- 2.2. Influencia de la salinidad
- 2.3. Influencia del oxígeno disuelto
- 2.4. Influencia de la turbidez
- 2.5. Condiciones óptimas





**Los microorganismos contaminantes se encuentran tanto sobre la concha de los moluscos como en la masa viscerai.**

### 1.1.1. Los sifones

Son dos estructuras musculosas, de forma tubular, originadas a partir del manto, que forma dos aberturas o sifones: el sifón dorsal o "exhalante" y el ventral o "inhalante". Ambos al servicio de la circulación del agua en el interior del molusco, para lo que poseen su superficie interna tapizada de cilios.

El tipo de habitat y la forma de alimentación de cada especie de molusco bivalvo determina las características morfológicas de los sifones. Si hacemos una clasificación somera de los moluscos, atendiendo a estos dos factores, obtendríamos que:

a) Los moluscos que viven enterrados, tendrán los sifones suficientemente largos para acceder hasta el agua, que les aporta oxígeno y alimento.

b) Aquellos otros moluscos que son suspensívoros (se alimentan de partículas en suspensión) pueden tener los sifones relativamente cortos y soldados entre sí hasta su extremo. Incluso pueden quedar reducidos a 2 cámaras de la cavidad paleal (la inhalante, situada entre las branquias y el manto, y la exhalante, delimitada por la cara interna de las branquias)

c) Los bivalvos detritívoros, es decir que se alimentan de partículas depositadas sobre el fondo, necesitan de un largo sifón inhalante capaz de explorar la superficie del sedimento en los alrededores de su punto de ubicación y que no puede, por ello, estar soldado al sifón exhalante más que en su base.

### 1.1.2. Las branquias

En el manto y las branquias se produce el intercambio gaseoso del oxígeno disuelto en el agua del mar con el líquido circulatorio del animal. Por otra parte, debido al mecanismo de la filtración, en la mayoría de los

bivalvos, las branquias están muy modificadas y, según la especie, pueden adoptar diversas formas y estructuras.

Generalmente, hay dos branquias, una a cada lado del plano sagital, presentando los filamentos de cada lado del eje central un gran alargamiento. Como los extremos de estos filamentos se pliegan hacia el eje central, adquieren la forma típica en W. Los filamentos, situados unos al lado de los otros, se unen mediante cilios o por tejidos de unión, formando las laminillas, como superficies con muchos tubos verticales en el interior para la circulación del agua. La presencia de este tipo de branquias, valió a los moluscos bivalvos, el nombre, con que también se les conoce, de lamelibranquios.

Además, estas branquias ayudan en la captación de las partículas alimenticias y, por ello, con frecuencia tienen una gran superficie, llegando a calcularse que un mejillón de 6-7 cm, tiene unos 100-110 cm<sup>2</sup> de superficie branquial.

La superficie de las branquias de los bivalvos está revestida de cilios y células secretoras de mucus que ayudan a crear la corriente alimentaria y que baten más deprisa cuando es menor el oxígeno o las aguas son más cálidas (que son, por otra parte, las de menor contenido en oxígeno).

## Las branquias de los moluscos bivalvos

Las branquias de los moluscos tienen dos funciones fundamentales: 1. El intercambio gaseoso de la respiración y 2. La participación en la captación de partículas.

Probablemente relacionado con esta segunda función de las branquias esté el hecho del diferente grado de complejidad que alcanzan, según las especies. Cuanto más sencilla es la estructura de la branquia más predomina la función respiratoria sobre la alimenticia. En el mejillón, por ejemplo, gran parte de los alimentos son atraídos hacia la boca gracias a una corriente de agua provocada por los movimientos de los cilios que recubren los palpos labiales (cuatro órganos con forma de pequeñas hojas, situados alrededor de la boca).

Según ese grado de complejidad, distinguimos:

a) Filibranquias. Son las branquias más sencillas, como las del mejillón o la vieira.

b) Pseudolamelibranquias, ya más complejas como en la ostra.

c) Eulamelibranquias, más especializadas, como en la navaja o el longueirón.





Los moluscos concentran activamente los microorganismos que pueden encontrarse en el agua que "beben".

### 1.1.3. El aparato digestivo

Está formado por la boca, con o sin palpos labiales, el esófago, el estómago, que presenta en su interior un saco con el estilo cristalino (al que los cilios del saco hacen girar constantemente), la glándula digestiva, y, por último, el intestino que termina en el ano, cerca del sifón exhalante.

## 1.2. MECANISMO DE LA FILTRACION Y RETENCION DE PARTICULAS

### 1.2.1. La circulación del agua

La mayoría de los bivalvos tienen una circulación del agua en forma de "U" en la cavidad paleal, entrando por la parte posterior ventral (sifón inhalante) y tras recorrer las branquias y atravesarlas sale de nuevo por la parte posterior, pero dorsal (sifón exhalante). Así, con frecuencia, los sifones son vecinos en su recorrido y se encuentran uno encima de otro.

### 1.2.2. De las branquias a la boca

Los cilios de las branquias también hacen de cedazo para retener las partículas de determinado tamaño, que entran con el agua, y las mezclan con el mucus segregado por las células glandulares. Esta mezcla es dirigida hacia la boca, que se encuentra rodeada de los palpos bucales, que hacen una segunda selección.

Los glomérulos mucosos de mayor tamaño no podrán ser llevados hasta los palpos bucales y salen por el sifón exhalante en forma de "pseudoheces".

### 1.2.3. El recorrido de la partículas en el aparato digestivo

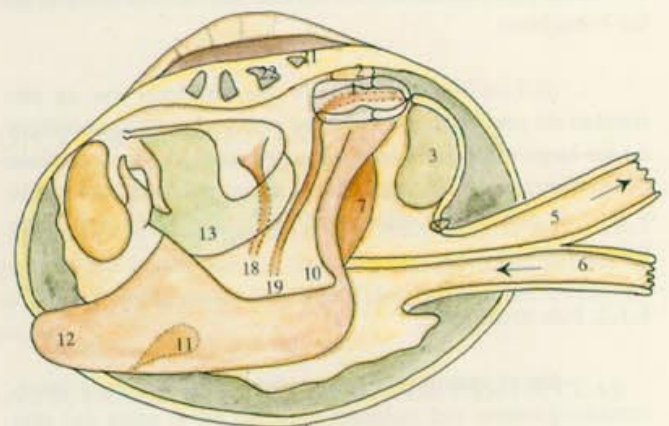
Las otras porciones, que han sido transportadas hasta los palpos bucales, son seleccionadas por estos en función de su tamaño, textura y, quizás, su "gusto", penetrando en la boca. Se sabe que los bivalvos en general, tienen una alimentación selectiva tanto en tamaño de las partículas como respecto a las especies del fitoplancton.

Una vez que las partículas penetran en el esófago, recorren poco a poco, el tracto digestivo: pasan al estómago, rodeado de la glándula digestiva conocida con el nombre de "hepatopáncreas", que dispone de un estilete, que libera enzimas digestivos.

Más tarde, los alimentos pasan al intestino tras ser aprovechados en sus posibilidades alimentarias por la glándula digestiva y los ciegos de la misma. El intestino es largo y forma varias curvas y termina en un recto que atraviesa el pericardio y el ventrículo del corazón. Desemboca en el ano, cerca del area de donde parten corrientes exhalantes que expulsan las heces (en este caso, verdaderas) por el sifón.

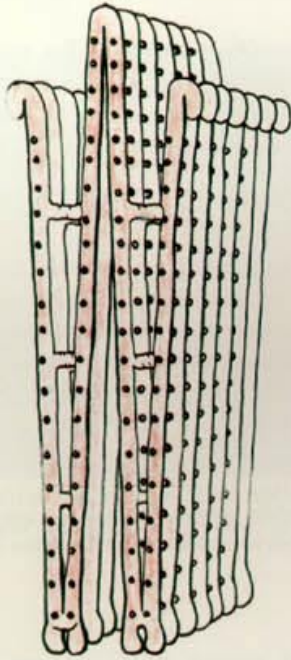
## 2 FILTRACION, ALIMENTACION Y CONCENTRACION BACTERIANA

Las bacterias más grandes siguen, en el interior del molusco, el mismo recorrido que las demás partículas. El mejillón, por ejemplo, no parece ser capaz de filtrar partículas menores de 1 o 2 $\mu$  y en la volandeira la filtración no es eficaz más que para gérmenes mayores de 6-7 $\mu$ . Sin embargo, no conviene deshechar la posibilidad de que bacterias menores de ese tamaño puedan quedar retenidas en los distintos tramos por los que pasa la corriente de agua, ya que es posible que se adhieran a partículas de mayor tamaño.



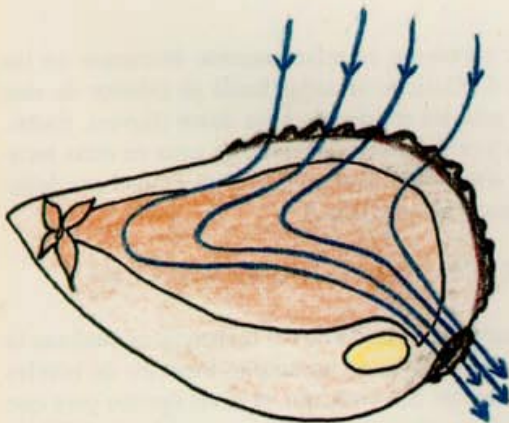
El hábitat y la forma de alimentarse determina en los moluscos la morfología de los sifones.





**Las branquias de los moluscos ayudan a la captación de partículas alimenticias y, por tanto, a la captación de gérmenes.**

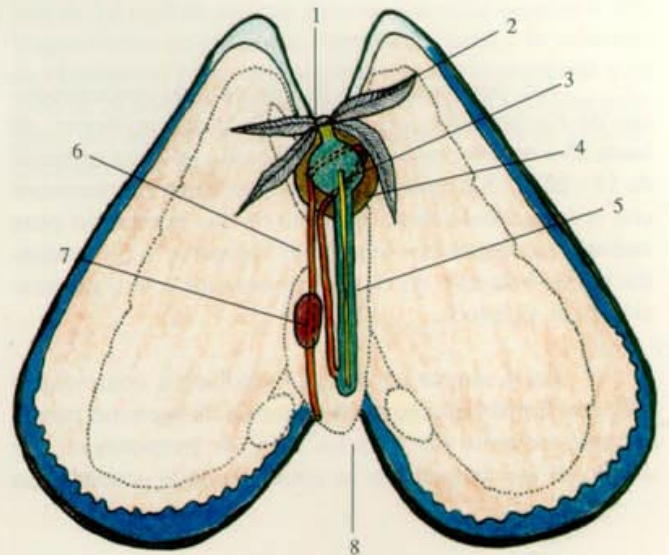
Se estima que las bacterias, en algunos momentos, cuando sus concentraciones son normales o bajas y escasea el fitoplancton, pueden jugar un papel en la nutrición de los moluscos y, de este modo, los bivalvos eliminarían una parte de las presentes en el medio marino. Pero cuando el número de bacterias es alto y además tienen a su alcance gran cantidad de fitoplancton, las bacterias pueden acumularse en su tracto digestivo y sólo pueden ser eliminadas por las heces cuando el molusco se encuentra en período de filtración continua ("bebiendo").



**La mayoría de los bivalvos tienen una circulación de agua en forma de U.**

La relación entre la concentración de bacterias en el organismo y el agua ambiente es un equilibrio dinámico. Cuando esa relación es igual a 1 (igual concentración, en el organismo y en el agua circundante) se habrá llegado al "punto de equilibrio".

En el caso de que la contaminación bacteriana del agua circundante baje significativamente, también baja la concentración de gérmenes en el molusco. Este proceso es bastante rápido, aunque parece depender, entre otros factores, de las características de las especies (si bien, la influencia de la especie bacteriana es muy discutida). Así, colocando mejillones contaminados de *Escherichia coli* en agua exenta de gérmenes, en el plazo de 6 a 10 horas la mayor parte de la población ha reducido considerablemente su población bacteriana, alcanzando el punto de equilibrio.



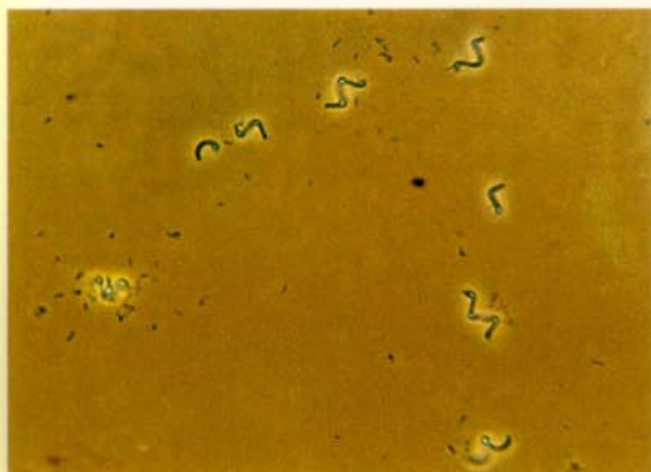
**El aparato digestivo desempeña un papel esencial en la concentración de microorganismos por los moluscos y en su depuración.**

Ese equilibrio dinámico depende de numerosos factores externos, entre los que destacan la temperatura, la salinidad, el oxígeno disuelto, la turbidez, etc.

## 2.1. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA

La influencia de la temperatura del agua circundante es un factor de primer orden a considerar, en relación al equilibrio de las concentraciones bacterianas en el molusco y en el agua.





**Quando escasea el fitoplancton, las bacterias pueden jugar un importante papel en la nutrición de algunos moluscos.**

Así, por ejemplo, se han encontrado concentraciones de *Escherichia coli* en el interior de mejillones, de hasta 25 o más veces la correspondiente a un agua ambiente de 18 - 20 °C. Sin embargo, estas cifras bajan enormemente con la temperatura, hasta el punto de que la relación entre ambas concentraciones llega a ser menor de 1 (la concentración de bacterias en el agua es superior a la concentración en el molusco).

En la mayor parte de los moluscos comerciales gallegos el nivel óptimo de eliminación de bacterias parece encontrarse entre los 13 y los 22°C de temperatura. Por debajo de esa temperatura se inhibe, tanto la acumulación



**Una cierta turbidez del agua, sin sobrepasar determinados límites, parece ser necesaria a los moluscos para efectuar la depuración.**

como la eliminación de bacterias. Por encima de esas temperaturas, se producen otros efectos indeseados que entorpecen la depuración: descenso de oxígeno disuelto en el agua, aceleración del metabolismo de los moluscos, etc.

## 2.2. INFLUENCIA DE LA SALINIDAD

El límite inferior de salinidad para la eliminación de bacterias del aparato digestivo de los bivalvos de Galicia con interés comercial se sitúa en el 16 por mil, aunque en la bibliografía científica se citan casos de depuración relativamente eficaz, en salinidades por debajo de ese valor (nunca, por debajo del 7 u 8 por mil). En el caso del mejillón, el límite se sitúa entre el 16 y el 18, ya que por debajo de esos valores el mejillón detiene la eliminación de bacterias al poco tiempo y, al cabo de 8 o 10 horas, muere.



**Para evitar las capas de agua dulce las depuradoras disponen el punto de toma del agua marina a varios metros de profundidad.**

Este problema es relativamente frecuente en las depuradoras de Galicia, situadas hacia el interior de rias que recogen grandes aportes de agua dulce (lluvias, riadas, etc). Por esta y otras razones, la toma de agua en estas localizaciones se sitúa a una determinada profundidad por debajo de la bajamar viva equinocial.

## 2.3. INFLUENCIA DEL OXIGENO DISUELTO

La mayoría de los bivalvos comerciales, realizan la eliminación de bacterias en un amplio espectro de niveles de oxígeno disuelto. Sin embargo, el nivel óptimo para que esa eliminación se haga con suficiente rapidez, se sitúa a partir de los 5,5 mg de oxígeno por litro de agua.





**La temperatura del agua es un factor determinante en el equilibrio de las concentraciones bacterianas del agua y el molusco.**

Hay que tener en cuenta que por debajo de ciertos valores de oxígeno disuelto los moluscos sufren de tal modo que al sacarlos del agua no resisten grandes períodos en seco, por lo que pierden valor en la comercialización.

Este problema no suele darse en las Estaciones depuradoras gallegas, pero sí en las depuradoras mediterráneas, en las que el agua sobrepasa, con frecuencia, los 22°C

de temperatura con lo que baja la concentración de oxígeno disuelto.

#### 2.4. INFLUENCIA DE LA TURBIDEZ

Para una efectiva eliminación bacteriana, los bivalvos necesitan que el agua esté ligeramente turbia, aunque no en exceso. La causa de este hecho parece estar relacionada con el descenso de volumen del contenido estomacal. Por supuesto, tampoco un agua excesivamente turbia es buena para una eficaz eliminación bacteriana. Este límite superior de tolerancia se sitúa alrededor de los 70 mg/litro.

#### 2.5. CONDICIONES OPTIMAS

Hasta aquí, hemos estudiado la influencia de los factores externos más importantes, considerándolos aislados. Sin embargo, la realidad impone la acción conjunta y sincrónica de todos ellos. En este sentido, en un agua que se acerca a las condiciones óptimas para todos los factores (en el caso de los moluscos comerciales gallegos: 14-18 °C de temperatura, más de 5,5 mg/l de oxígeno disuelto, salinidad superior a 30‰ y agua exenta de gérmenes, ligeramente turbia), la velocidad de eliminación bacteriana sigue una curva exponencial y, al cabo de 24 horas se eliminan el 90-95% de las bacterias patógenas del aparato digestivo, aún cuando se parta de concentraciones muy altas.



# Actividades

## Autoevaluación

**1** Relacionar y diferenciar las siguientes parejas de términos y conceptos:

- a. Sifón exhalante - Sifón inhalante
- b. Filtración - Alimentación
- c. Heces - Pseudoheces
- d. Punto de equilibrio - Concentración bacteriana

**2** Rellenar el cuadro, señalando la función que cumple en los bivalvos cada uno de los órganos citados en relación a la filtración, respiración y alimentación. Si con respecto alguna de las funciones biológicas no cumple algún papel, señalarlo con un guión largo.

|                 | FILTRACION | RESPIRACION | ALIMENTACION |
|-----------------|------------|-------------|--------------|
| Palpo labial    |            |             |              |
| Hepatopáncreas  |            |             |              |
| Branquias       |            |             |              |
| Sifón inhalante |            |             |              |
| Sifón exhalante |            |             |              |
| Intestino       |            |             |              |

**3** Contestar, según corresponda, SI, NO o DEPENDE, cada una de las siguientes frases.

- a. El mejillón filtra cualquier partícula menor de 10  $\mu$ .
- b. La relación entre las concentraciones de un organismo en el agua y en el molusco que "bebe" ese agua, es mayor en el molusco.
- c. A mayor temperatura del agua, mayor concentración bacteriana en el molusco.
- d. Si la salinidad del agua está por debajo del 7 por mil los moluscos comerciales de Galicia no depuran.

**4** Rellenar el cuadro, definiendo los límites de tolerancia (o la medida óptima) de los factores que se indican para que la depuración de los bivalvos sea eficaz.

|             | LIMITES DE TOLERANCIA |
|-------------|-----------------------|
| Salinidad   |                       |
| Temperatura |                       |
| Oxígeno     |                       |
| Turbidez    |                       |

## Aplicaciones

**1** Del mismo modo que existen agentes patógenos para el hombre pero que son inócuos para el molusco que los alberga (lo que, en definitiva permite la depuración), también hay agentes patógenos que siendo inócuos para el hombre provocan enfermedad en los moluscos. Ayudándose de la bibliografía adecuada sobre patología de moluscos, encontrar algunos de esos agentes etiológicos, así como la enfermedad que provocan en los moluscos.

**2** La filtración en los animales marinos se basa en la existencia de uno o varios cedazos o tamices biológicos que retienen las partículas alimenticias y permite la circulación del agua. Investigar los órganos que cumplen esa función en los animales que se citan:

- A. Ballena
- B. Sabelias
- C. Arenque
- D. Crustáceos filtradores

## Conoce tu entorno

**1** La acumulación en los animales de gérmenes patógenos para el hombre como consecuencia de la alimentación es muy frecuente, también en los animales terrestres. Investigar alguno de esos gérmenes así como la enfermedad que producen en los animales que se citan:

- A. Perro
- B. Vaca
- C. Oveja
- D. Cerdo

**2** Evidentemente no todos los microorganismos que alberga el organismo humano son nocivos. Por el contrario, algunos son beneficiosos y cumplen funciones biológicas de suma importancia para el organismo hospedador. Tal es el caso de la llamada "flora intestinal" en la especie humana. Investigar la naturaleza de ese conjunto de microorganismos y su papel biológico.



# 5

## Agentes y sistemas de depuración de aguas marinas aplicados a la depuración de moluscos

### Contenido

#### 1. Cloración

- 1.1. Dosis
- 1.2. Técnica
- 1.3. Ventajas e inconvenientes

#### 2. Ozonación

- 2.1. Técnica

#### 3. Esterilización por Radiación Ultravioleta

- 3.1. Técnica
- 3.2. Dosis
- 3.3. La radiación U.V. en la depuración de grandes volúmenes.

#### 4. U.V. - Generador de ozono

#### 5. Método de cloro naciente

#### 6. Generación de cloro naciente mixto con ozono

#### 7. Iodóforos

#### 8. Ultrasonidos

#### 9. Ión Stick

Ya hemos visto que una Estación Depuradora de moluscos es una industria que, esencialmente, se limita a colocar los animales durante, como mínimo 42 horas, en un agua exenta de gérmenes patógenos, más concretamente de bacterias patógenas, para que los bivalvos, "bebiendo" o filtrando, se autodepuren y expulsen los microorganismos patógenos que pueden traer acumulados en su organismo.

Así pues, la primera tarea del depurador será definir cual agente depurador o esterilizador va a emplear para conseguir ese agua "limpia", no contaminada. El agente elegido condicionará el sistema o técnica a emplear y, por último, la técnica utilizada impondrá cuestiones esenciales al diseño básico de la Depuradora.

Hay muchos agentes y métodos, químicos y físicos, para depurar de gérmenes patógenos el agua marina. Algunos se han aplicado de forma experimental, otros, en cambio, se utilizan ampliamente en las industrias y estaciones depuradoras. Entre estos últimos citaremos:

- Cloración
- ozonización
- esterilización por Radiación Ultravioleta

Aunque en la actualidad se están ensayando muchos métodos alternativos a los anteriores, su escasa presencia en la industria todavía no permite una evaluación exacta de sus posibilidades, si bien, algunos de ellos, parecen dar resultados prometedores a quienes los han aplicado y ensayan. Citaremos:

- UV - Generador de ozono
- Generador electrolítico de cloro
- Generación de cloro naciente (electrolítico) mixto con ozono
- Iodóforos en forma líquida
- Aplicación de ultrasonidos

### 1 EL CLORO COMO AGENTE DEPURADOR DEL AGUA MARINA

La depuración por cloro o cloración es el sistema más extendido en el mundo, tanto en los países desarrollados como en aquellos en vías de desarrollo. En los Estados Unidos, donde las normativas sanitarias para las aguas de abastecimiento a las poblaciones son muy exigentes, el 96% de éstas utilizan la cloración como método de esterilización. Actualmente, en España y especialmente en Galicia, casi todas las depuradoras, depuran utilizando como agente depurador el cloro-gas.

La actividad bactericida del cloro se debe al gran poder oxidante de los iones  $Cl^-$  y  $ClO^-$ , que se forman en contacto con el agua. Estos iones provocan el ataque químico de la membrana celular y cuando la dosis es elevada, afecta también a las estructuras intracelulares.





**La adición de cloro al agua puede hacerse a partir de bombonas de cloro-gas o de hipoclorito.**

La cloración consiste, básicamente, en la adición de alguna forma de cloro activo al agua, ya sea suministrado en forma de cloro-gas en bombonas o en forma de hipoclorito (lejía), en dosis adecuada para matar la flora bacteriana y gérmenes patógenos sensibles al mismo.

### 1.1. DOSIFICACION DEL CLORO

La dosificación del cloro necesario para depurar varía mucho de unos lugares a otros. También varía con la temperatura del agua, el contenido de materia orgánica, la turbidez, así como con la flora bacteriana. La dosis de cloro a inyectar en el agua se calcula de tal forma que en el penúltimo tanque de eliminación del cloro, quede sólo cloro residual y que en el último no quede ninguno, de tal forma que, a las tres o cinco horas de contacto entre el agua y el cloro, dicha agua quede depurada.

Los sistemas de dosificación (clorómetros) se fabrican en serie, pues se emplean en casi todos los abastecimientos de aguas municipales. En el caso de utilizar el hipoclorito, se recurre a bombas dosificadoras, que tienen

el inconveniente de ser de más difícil regulación y mantenimiento y requerir una mayor vigilancia y cuidado.

### 1.2. LA TECNICA

Consiste, esencialmente, en los siguientes pasos:

- a) Captación de agua del mar en cantidad y de calidad suficiente.
- b) Adición del cloro activo (sea en forma de gas o de hipoclorito) al agua en dosis suficiente para su depuración.

La adición se realiza directamente en el agua de mar captada desde la estación de bombeo, mediante los clorómetros, en los casos de utilizar cloro-gas, o mediante las bombas dosificadoras, en el caso de emplearse hipoclorito.

- c) Permanencia del cloro en el agua durante el tiempo suficiente para llevar a cabo esa depuración.

El agua clorada pasa al sistema de eliminación del cloro. Este sistema consiste en unos depósitos de gran volumen en los que el agua debe circular en movimiento y con cierta agitación, durante unas cuatro horas.

- d) Eliminación total del cloro, incluso el residual

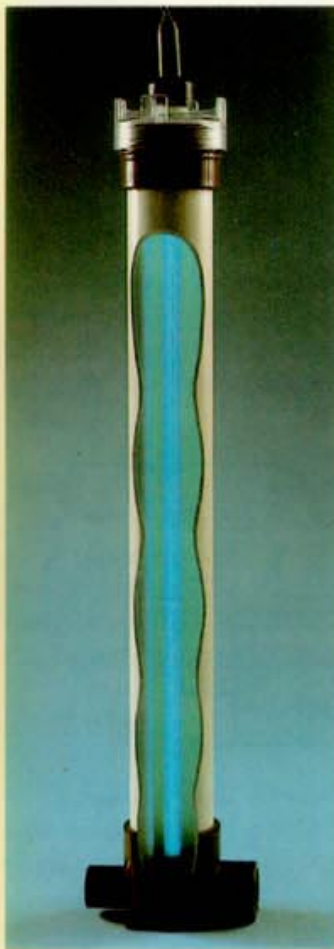
Del último de los compartimentos de los tanques de eliminación del cloro, se analiza que no quede ningún resto de cloro. Si no fuese así, se elimina mediante técnicas de absorción sobre carbón activo o mediante el empleo de agentes reductores, como el tiosulfato sódico o las sales ferrosas.

- c) Paso continuo, durante 42 horas, del agua depurada a las piscinas de estabulación del molusco.



**El agua tratada con ozono debe airearse fuertemente en "torres de cascadeo".**





**La radiación ultravioleta es un potente germicida**

Ya eliminado todo el cloro y el agua depurada de gérmenes patógenos, se envía el agua, en circuito abierto y continuo durante 42 horas (según marca la legislación española) a las piscinas de depuración.

#### d) Control de patógenos en el agua

Este control, con las técnicas y análisis que se incluyen en otro capítulo, se realiza tanto al agua de entrada y salida de las piscinas de depuración, como a los moluscos, al principio y al final del proceso.

### 1.3. VENTAJAS E INCONVENIENTES DEL CLORO COMO AGENTE ESTERILIZADOR EN LAS DEPURADORAS.

Este sistema, tiene las ventajas de la facilidad de abastecimiento, sea en forma de cloro-gas en bombonas o en forma de hipoclorito (lejía), de su precio económico y fácil manejo, si bien en el caso del cloro-gas, deben tomarse precauciones por ser altamente tóxico.

Los inconvenientes principales que presenta la utilización del cloro en la depuración de moluscos son:

a) Necesita de una instalación de eliminación del cloro muy voluminosa, ya que requiere de 3 a 5 o 6 horas de contacto agitado con la atmósfera para que sea eliminado.

b) La eliminación del cloro ha de ser absoluta, puesto que, si queda algún residuo en el agua, éste afecta a los moluscos que se cierran y evitan, de este modo, que la depuración se lleve a efecto.

c) Una decloración absoluta, requiere aplicar técnicas de absorción sobre carbón activo o utilización de agentes reductores, como tiosulfato sódico o sales ferrosas.

## 2 OZONACION

El ozono tiene una acción germicida y potente virucida; no afecta al sabor, olor ni color del agua; su acción es rápida y no sostenida. Su potencia bactericida es del orden de 25 veces mayor que la del cloro (ácido hipocloroso) y cuatro veces mayor como esporicida.

También destaca su selectividad, en algunos casos. Así, frente al germen patógeno *Escherichia coli* es 3.125 veces más rápido que el cloro.

Esta rapidez de acción es otra característica en la que supera al cloro, unas 10 veces por término medio. Por ejemplo, una dosis de 0,05 a 0,45 partes por millón de ozono destruye, en dos minutos, el virus de la poliomielitis, mientras que el cloro, con una dosis de 0,05 a 1 partes millón, necesitaría, para obtener el mismo efecto, de 90 a 180 minutos.

Otra ventaja, respecto del cloro, es que el agua ozonizada se carga, como consecuencia de la destrucción del ozono residual, con una cantidad notable de oxígeno disuelto que lo hace muy apto para albergar seres marinos vivos.

### Generador de ozono

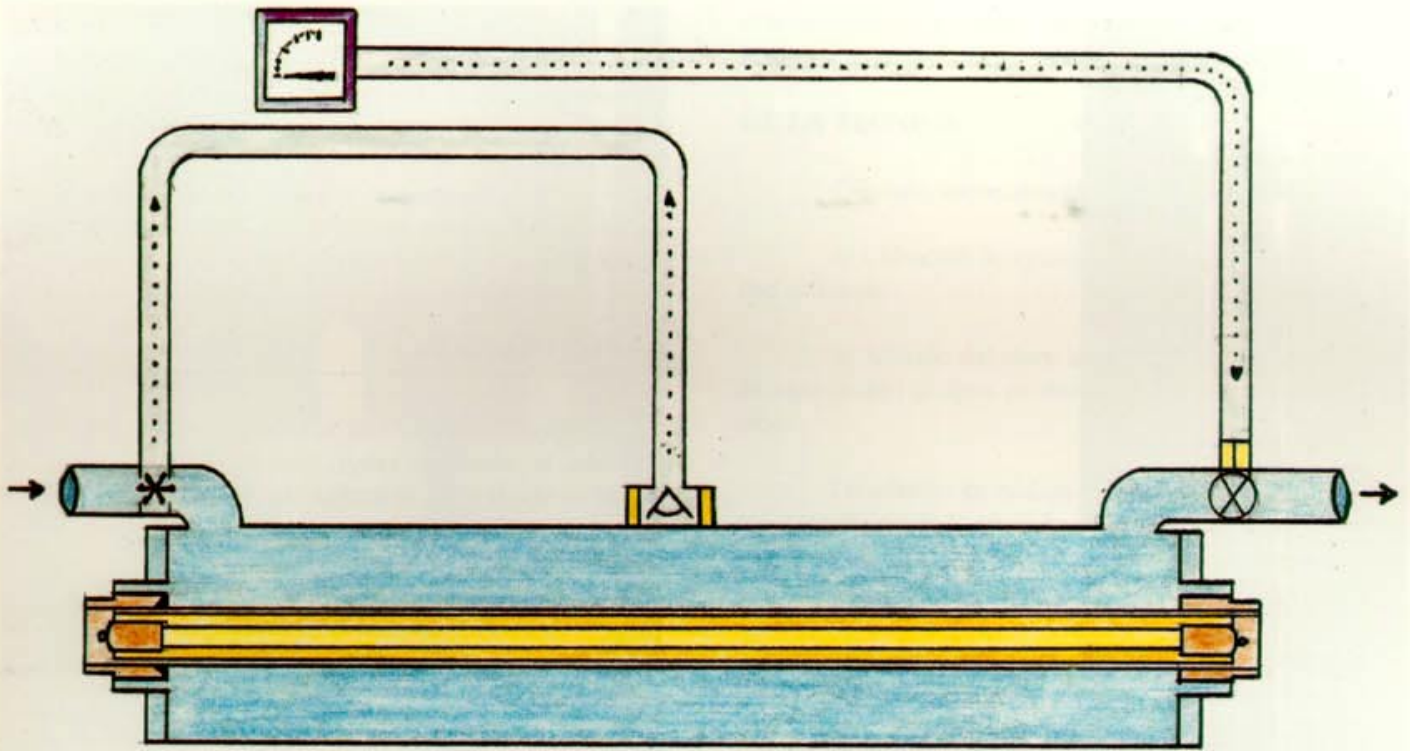
Las moléculas de Ozono ( $O_3$ ) se originan a partir de las moléculas de Oxígeno ( $O_2$ ). Mediante una excitación, las moléculas de oxígeno se descomponen en oxígeno atómico. Por la colisión de estos átomos de oxígeno se forma el Ozono.

La excitación de la molécula de Oxígeno se logra sometiendo el aire seco (que contiene, aproximadamente un 21% de oxígeno) u oxígeno puro a la descarga de un arco voltaico.

En los equipos generadores de ozono más usuales, es frecuente el empleo de aire seco. Dado que niveles muy pequeños de agua (0,02 o 0,03 mg/l) merman enormemente la eficacia del método, para conseguir el aire seco, es preciso emplear un desecador, que se utilizará previamente al paso a través del arco voltaico.

Los desecadores usan, normalmente, cloruro de calcio y sílica gel.





La fuente de U.V. es un sistema de tubos radiantes protegidos con cristal de cuarzo

## 2.1. LA TECNICA

El ozono se produce, a partir de aire seco, en un aparato llamado generador de ozono.

Debido a su enorme poder oxidante, en dosis muy bajas elimina o inactiva a los microorganismos patógenos. Sin embargo, por esa misma razón, aún en pequeñas cantidades, resulta tóxico para los moluscos bivalvos, y por ello el agua tratada debe airearse fuertemente (torre de casca-deo), antes de su envío a los tanques o piscinas de estabulación, controlando permanentemente los niveles de ozono residual.

Sin embargo, no es aconsejable la introducción masiva de ozono de una sola vez en el agua de depuración, ya que no se obtiene un buen rendimiento. La cantidad de ozono autodestruida, y por ello no utilizada, sería superior a la que resultaría de llevarse a cabo introducciones sucesivas, relativamente distanciadas en el tiempo, para mantener un nivel de ozono mínimo pero suficiente.

Es preciso destacar que el ozono se descompone a la mitad en un período que oscila, según la calidad del agua, entre los 10 y los 30 minutos. Por ello, hay que estar dosificando constantemente el aporte de ozono, sobre todo cuando se varía el caudal del agua de la depuradora, lo que resulta un proceso enojoso y complicado.

## 3 ESTERILIZACION POR RADIACION ULTRAVIOLETA

La radiación Ultravioleta, que incluye longitudes de onda entre 15 y 400 nm (aunque su mayor eficacia esterilizadora, se encuentra alrededor de los 260 nm), provoca efectos en el ácido desoxirribonucleico (ADN) de los microorganismos y a dosis adecuadas, la muerte.

En los intentos por eliminar agentes químicos depuradores, que siempre alteran las características del agua, buscando su sustitución por agentes físicos que no alteren aquellas características, se acudió a las radiaciones ultravioletas que, a su alto poder germicida, añaden las ventajas de reducir considerablemente el período de tiempo de contacto del agente esterilizador con el agua y no necesitar de un sistema de eliminación de dicho agente. Por otra parte, no confieren sabor ni olor al agua o al molusco.

### 3.1. LA TECNICA

La técnica, en esencia, consiste en una fuente de radiación o lámpara ultravioleta (generalmente, estas lámparas son tubos germicidas parecidos, en su aspecto externo, a los tubos fluorescentes) que irradia una fina capa de agua, que, de este modo, queda esterilizada.



Hay generalmente dos sistemas: 1) aquellos en que el tubo radiante está en el interior de un tubo de cristal de cuarzo muy permeable a los rayos UV, que es el que está en contacto, por su cara externa, con el agua de mar y 2) aquellos en que el agua corre por el interior de tubos de cristal de cuarzo y los tubos de UV se sitúan alrededor de los mismos.

Tanto en un caso como en el otro, las tuberías del agua y las lámparas UV suelen estar encerradas en una estructura de PVC, acero inoxidable o material similar, que no sea afectada por el agua marina o por la radiación.

Es importante que, dentro de la tubería, el agua no circule laminarmente o se estratifique, a fin de que toda la masa reciba una cantidad similar de radiación. Para ello, la entrada y salida del agua se suele hacer por puntos distantes entre los que se instalan deflectores que obligan a circular el agua en espiral.

### 3.2. DOSIS

Las dosis de ultravioleta en depuración son similares a las empleadas en desinfección del agua (por ejemplo, en las industrias embotelladoras de refrescos) para consumo humano, salvo cuando se intentan eliminar especies muy resistentes, como el virus IPN que necesita 200 mJ/m<sup>2</sup> para inactivación al 99,9%. Como comparación diremos que el virus IHN solo requiere 2 mJ/m<sup>2</sup> para la misma inactivación.

### 3.3. LAS RADIACIONES U.V. EN LA DEPURACION DE GRANDES VOLUMENES

Entre los inconvenientes de este método, tan eficaz y empleado en el tratamiento de pequeños caudales (criaderos, etc), conviene destacar:

- Si el agua a esterilizar contiene muchas partículas en suspensión, la penetración de la radiación UV, ya por su naturaleza escasa, es muy reducida. En consecuencia, a la necesidad de someter a la radiación una capa de agua de pocos centímetros, se suma la obligatoriedad de eliminar previamente esas partículas del agua, lo que suele hacerse por filtración a 10 $\mu$ , siempre cara, sobre todo cuando se filtran grandes volúmenes.

Así, en Galicia, hubo depuradoras de moluscos que iniciaron su actividad industrial con Ultravioleta, pero enseguida se pasaron al cloro, ya que además de la filtración necesitaban de una gran dosis de radiación para que penetraran con eficacia los rayos UV, lo que se tradujo en un alto costo de la energía eléctrica.

- Por la escasa capacidad de penetración en el agua (unos pocos centímetros). Para radiar eficazmente grandes caudales, se necesitan superficies enormes de radiación.

- Las lámparas envejecen y pierden potencia, lo que obliga a sustituirlas cada cierto tiempo (aproximadamente cada 8.000 horas de uso), elevando los gastos fijos de la instalación.

## 4 U.V. GENERADOR DE OZONO

Es un sistema utilizado en Estados Unidos, aunque no muy extendido. Consiste en que las lámparas ultravioletas (en lugar de ser alrededor de 254 nm están en los 180 nm), provocan un gas ionizado u oxígeno activado que, según algunos autores, tiene una capacidad germicida superior al ozono convencional.

Tiene una doble ventaja: aumenta la proporción de oxígeno en el agua (lo mismo que sucede en el tratamiento con ozono) y elimina los nitritos, transformándolos en nitratos.



*Las tuberías de agua y las lámparas de U.V. suelen estar encerradas en una estructura protectora.*



## 5 METODO DEL CLORO NACIENTE

---

Un sistema de depuración, aún no probado en la depuración de moluscos, pero sí empleado en la depuración de aguas domésticas es el generador electrolítico de cloro, también llamado método del cloro naciente.

Es un método, propiciado por la Organización Mundial de la salud, para quien " la desinfección mediante aparatos de cloración alimentados por gas, está supeditada al abastecimiento de las bombonas de cloro, y no es fiable en instalaciones rurales, incluso en países industrializados y aún menos en los países en desarrollo porque el equipo es complejo, hay que transportar el cloro y tomar las necesarias medidas de seguridad. Es posible que se utilicen cada vez más, los generadores electrolíticos de cloro, que permiten la producción local".

## 6 GENERACION DEL CLORO NACIENTE MIXTO CON OZONO

---

Es un sistema que todavía no se ha aplicado a nivel industrial, pero que, al unir las ventajas del tratamiento mixto del cloro y del ozono y reducir sus inconvenientes, es avalado por algunos centros de investigación.

Sus ventajas teóricas serían:

- Una acción de depuración más segura, por ser más potente y rápida, lo que supone la innecesidad de grandes tanques.
- Su acción letal, llega a las esporas y algas, teniendo también una notable acción virucida.
- Manejo fácil y flexibilidad de uso. Costes de mantenimiento más bajos.
- No hay suministradores de gas. No se requiere personal especializado y hay una gran seguridad en su manejo.

Entre sus inconvenientes, cabría destacar su alto precio inicial y el que no esté suficientemente experimentado a nivel industrial.

## 7 IODOFOROS

---

Este sistema llegó a aplicarse a la depuración de moluscos en varios países, especialmente en Italia. Se basa en la acción oxidante de los compuestos, en forma líquida, de yodo. Consistía en un sistema de recirculación de agua en el que se utilizaban cantidades variables de yodoformo por litro de agua del tanque, lo que produce una rápida

reducción de la flora bacteriana sin que, en apariencia, afectara a los bivalvos ni a sus características organolépticas. Hoy, este sistema ha caído en completo desuso.

## 8 ULTRASONIDOS

---

Es un sistema físico de depuración, ya experimentado por los alemanes durante la primera guerra mundial. En la actualidad se emplean baños ultrasónicos para esterilizar los instrumentos quirúrgicos en los hospitales.

La técnica, cuya aplicación en las depuradoras se basaría en la facilidad y velocidad de transmisión del sonido en el agua, consiste en la rotura, por la acción de ultrasonidos, de muchas de las estructuras del citoplasma celular y de la membrana exterior de la célula, provocándoles la muerte.

Las ventajas que ofrece esta técnica de esterilización, se refieren a la ausencia de elementos químicos agresivos, reducción de algunos gastos fijos del mantenimiento del generador y coste de la energía, sin depender de suministros ajenos. Entre sus inconvenientes, destaca el no haber sido ensayado industrialmente para grandes volúmenes de agua, si bien da resultados muy satisfactorios en pequeños y medios volúmenes.

## 9 ION STICK

---

Fué descubierto en 1970 por Chris Anderson y, hasta el momento, se aplicó con éxito en instalaciones de tratamiento de agua dulce de Canadá, Estados Unidos y Europa. Todavía no se ha comprobado su eficacia en el tratamiento de grandes volúmenes de agua marina.

La técnica se basa, en la inserción de una probeta cubierta de taflón dieléctricamente sellada y activada por una fuente de energía, en el suministro de agua. De este modo se produce un campo electrostático de alto voltaje, capaz de tratar 4.000 litros de agua por minuto, reduciendo completamente las colonias bacterianas.



## Autoevaluación

**1** De los siguientes agentes depuradores señalar cuales son físicos y cuales químicos:

Radiación Ultravioleta  
 Cloro naciente,  
 Ozono  
 Ultrasonidos  
 Cloro gas  
 Ión Stick  
 Hipoclorito

**2** Con los signos + (bueno) ± (regular) y - (malo), intentar valorar las cualidades que tiene el cloro como agente depurador:

|                                   | + | ± | - |
|-----------------------------------|---|---|---|
| Poder bactericida                 |   |   |   |
| Poder virucida                    |   |   |   |
| Poder fungicida                   |   |   |   |
| Coste de la instalación           |   |   |   |
| Coste del mantenimiento           |   |   |   |
| Facilidad de eliminación          |   |   |   |
| Alteración de cualidades del agua |   |   |   |
| Acción sobre los moluscos         |   |   |   |

**3** Suponiendo que los valores del Cloro, para cada uno de los conceptos de la anterior tabla, fuese igual a 1, señalar con los símbolos + (mejor), = (aproximadamente igual) o - (peor) los valores que tendrían el Ozono y la Radiación Ultravioleta:

|                                | CLORO | OZONO | U.V. |
|--------------------------------|-------|-------|------|
| Poder bactericida              | 1     |       |      |
| Poder virucida                 | 1     |       |      |
| Poder fungicida                | 1     |       |      |
| Coste de la instalación        | 1     |       |      |
| Coste del mantenimiento        | 1     |       |      |
| Facilidad de eliminación       | 1     |       |      |
| Alteración cualidades del agua | 1     |       |      |
| Acción sobre los moluscos      | 1     |       |      |

**4** Relacionar entre sí las dos series de términos:

|   |                 |   |                         |  |  |
|---|-----------------|---|-------------------------|--|--|
| A | Clorómetro      | 1 | Generador electrolítico |  |  |
| B | Lejía           | 2 | Longitud de onda        |  |  |
| C | Cloro naciente  | 3 | Tiosulfato sódico       |  |  |
| D | Absorción de Cl | 4 | Hipoclorito             |  |  |
| E | Ultravioleta    | 5 | Dosificación            |  |  |

## Aplicación

**1** Las propiedades del cloro determinan su aplicación en gran número de industrias. Investigar sus aplicaciones más frecuentes en los sectores que se citan:

- A. Industria papelera
- B. Industria metalúrgica
- C. Industria militar
- D. Industria sanitaria

**2** La Radiación Ultravioleta representa un grupo de ondas determinadas incluidas en la radiación solar natural. Sin embargo conocemos su potente poder biocida. ¿Que mecanismos existen en la naturaleza que moderan su acción destructiva?

**3** ¿Donde se encuentra con mayor abundancia el ozono natural? Describir brevemente su situación e importancia.

## Conoce el entorno

**1** La historia de la guerra química está estrechamente vinculada al Cloro. Así, el primer ataque con gases mortales fue lanzado por los alemanes, durante la 1ª Guerra Mundial, en Bélgica el 22 de abril de 1915, dejando que una gran nube de cloro, impulsada por el viento, alcanzase las trincheras inglesas. Con ayuda de la bibliografía adecuada redactar un breve reportaje sobre aquellos acontecimientos.

**2** Con ayuda de libros de química y otros especializados completar el cuadro, señalando los principales derivados de Cloro y la acción sobre las víctimas de cada uno de los grupos de sustancias indicados:

| GASES            | COMPUESTO DE CLORO | ACCIÓN SOBRE VÍCTIMA |
|------------------|--------------------|----------------------|
| ASFIXIANTE       | Cloropicrina       | Daña los pulmones    |
|                  | Difosgeno          | A veces mortal       |
|                  | Fosgeno            |                      |
| VESICANTE        |                    |                      |
| LACRIMOGENO      |                    |                      |
| ESTORNUTATORIO   |                    |                      |
| CORTINA DE HUMOS |                    |                      |



# 6

## Unidades estructurales en la planta depuradora

Una Estación Depuradora de moluscos requiere las siguientes unidades estructurales:

- Toma del agua marina
- Estación de bombeo
- Unidad de tratamiento del agua mediante la adición del agente oxidante o la acción del agente físico.
- Unidad de eliminación del agente depurador (según el agente empleado puede no ser necesario)
- Piscinas de depuración
- Sistema de depuración de los vertidos de la propia depuradora
- Laboratorio de control microbiológico
- Areas de trabajo auxiliares:
  - Area de recepción, lavado y preparación de moluscos
  - Area de servicio a las piscinas de depuración
  - Area de pesado y envasado de moluscos depurados
  - Area de carga de camiones y otros vehículos
  - Almacén de material
  - Oficinas
  - Areas de servicio de los trabajadores

### Contenido

1. Emplazamiento y captación de agua
2. Estación de bombeo
3. Unidad de tratamiento del agua
4. Eliminación del agente oxidante
5. Piscinas de depuración
6. Sistema de depuración de vertidos de la depuradora
7. Laboratorio de control
8. Areas auxiliares

## 1 EMPLAZAMIENTO Y TOMA DE AGUA

Las Estaciones Depuradoras son instalaciones terrestres, situadas en zonas litorales. El lugar elegido para su ubicación ha de reunir una serie de condiciones mínimas que garanticen su normal funcionamiento durante todo el año. Entre esas condiciones, unas afectan a la calidad y economía de la depuración propiamente dicha, otras afectan a la comercialización y el transporte.

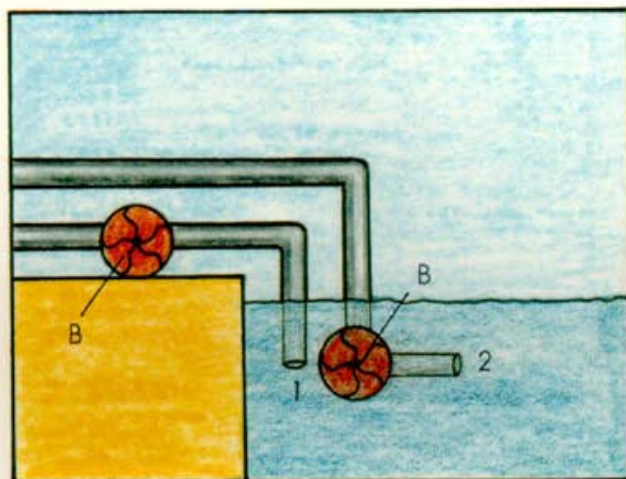
En primer lugar han de estar situadas en emplazamientos con fácil captación de agua marina de calidad, alejadas de focos de contaminación, tanto biológica como química (sobre todo, de esta última). En cualquier caso, por imposición legal incluso, en el punto de toma no podrá haber desagües, cloacas o emisores que puedan ser causantes de contaminación. Según dicta la normativa comunitaria (Directiva 91/492/CEE, DOCE nº L 268), “Los centros no deberán estar situados en zonas cercanas a malos olores, humos, polvo y otros elementos contaminantes, y no podrán estar expuestos a inundaciones debidas a la marea alta o a la afluencia de agua de zonas vecinas”.

En segundo lugar, requieren un espacio amplio, bien comunicado, de fácil acceso para vehículos de transporte y, normalmente, con muelle propio donde los barcos (“mejilloneros”, etc) puedan realizar la descarga.



Ya en otros capítulos de este texto hicimos referencia a la calidad del agua que capta una depuradora, en lo referente a los rangos de temperatura, salinidad, oxígeno disuelto, turbidez, pH, contenido en microorganismos, etc. Para garantizar que estos parámetros se mantengan en los límites definidos, la toma de agua de mar debe estar como mínimo a 2,5 m por debajo del nivel de bajamar viva equinoccial.

La captación del agua puede hacerse por cualquiera de los sistemas tradicionales: por captación directa del mar, ya sea mediante tuberías de aspiración o mediante canales o tuberías enterradas o por captación a través de pozos (aunque esta última modalidad es mucho menos utilizada).



Las bombas para captación de agua pueden estar en aspiración positiva o en carga. 1. Bomba en aspiración. 2. Bomba en carga.

## Depuradoras de moluscos ubicadas en las rías gallegas

| Rías          | Depuradoras | %Total |
|---------------|-------------|--------|
| A Coruña      | 4           | 8,5    |
| Ares-betanzos | 1           | 2,1    |
| Ferrol        | 2           | 4,2    |
| Muros-Noia    | 3           | 6,5    |
| Arousa        | 27          | 57,4   |
| Pontevedra    | 6           | 12,8   |
| Vigo          | 4           | 8,5    |
| TOTAL         | 47          | 100    |

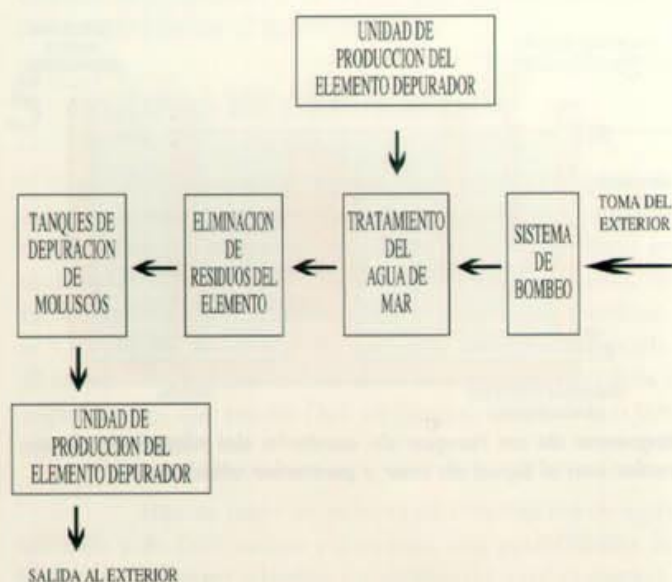


Diagrama estructural de una depuradora.

## 2 ESTACION DE BOMBEO

Varía mucho de unas depuradoras a otras, dependiendo de las características topográficas, sistema de captación del agua y dimensionamiento de la industria. Las bombas pueden estar situadas en aspiración positiva (por encima del nivel del agua en captación) o en carga (con presión negativa, es decir, la bomba colocada por debajo del nivel de agua en la captación).

Dado que la mayoría de las depuradoras suelen utilizar bombas en aspiración positiva, es preciso tener cuida-

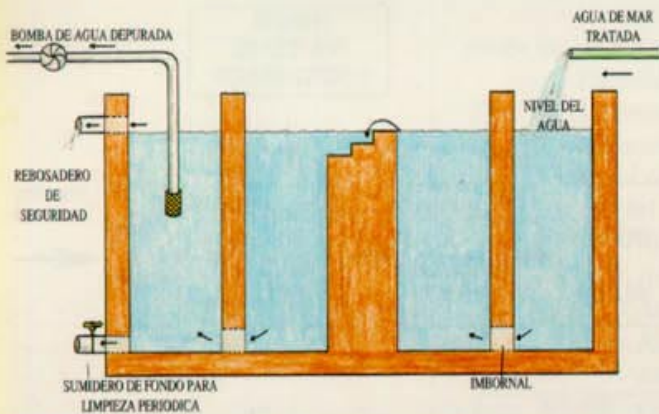


Desde el punto de toma, el agua se canaliza a través de grandes tuberías, adecuadas a los elevados caudales.

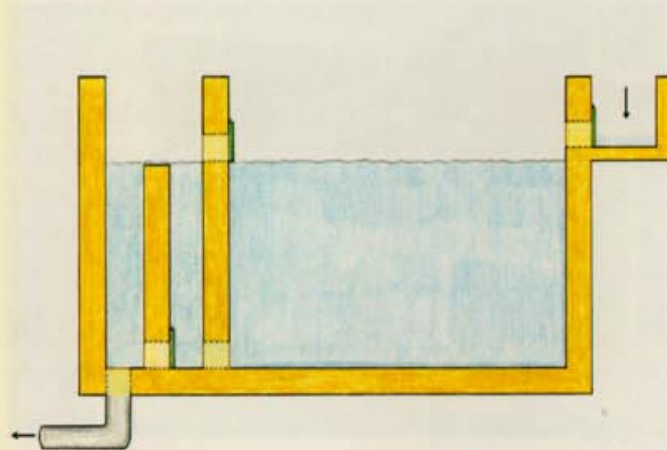




**Piscina en depuración**



**Esquema de un tanque de contacto del elemento depurador con el agua de mar y posterior eliminación.**



**Corte longitudinal de una piscina de depuración de moluscos**

do con los sistemas de cebado y las válvulas de retención colocadas en el punto de toma, que impiden el retroceso del agua (y, con ello, el descebado de la tubería).

Desde el punto de toma a la estación de bombeo, el agua se canaliza a través de tuberías, normalmente de PVC, cuyo diámetro y grosor de las paredes (presión) dependerá de los caudales que requiera la planta.

### 3 UNIDAD DE TRATAMIENTO DEL AGUA

El agua de mar captada (agua de alimentación de la planta) se esteriliza o depura, con el agente elegido, ya sea químico (Cloro-gas, hipoclorito, ozono, etc), físico (radiaciones Ultravioletas, ultrasonidos, ión Stick, etc) o mixto (U.V-generator de ozono, etc).



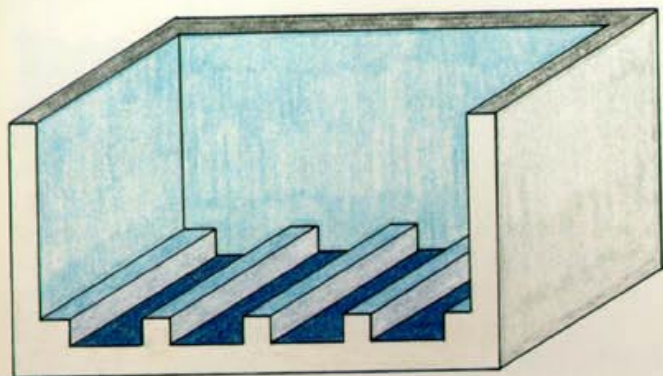
**Tanque de contacto del elemento depurador con el agua de mar y posterior eliminación.**

En consecuencia el diseño de esta unidad dependerá del agente depurador. Si se trata del cloro-gas se inyecta mediante clorómetros. En el caso del hipoclorito se emplean bombas dosificadoras. La técnica de ozonación requiere incorporar el generador de ozono. Si lo que se usa es el tratamiento por radiación Ultravioleta, se ha de prever una unidad de filtración previa para eliminar las partículas en suspensión y grandes superficies de circulación del agua sobre los que colocar los tubos U.V.

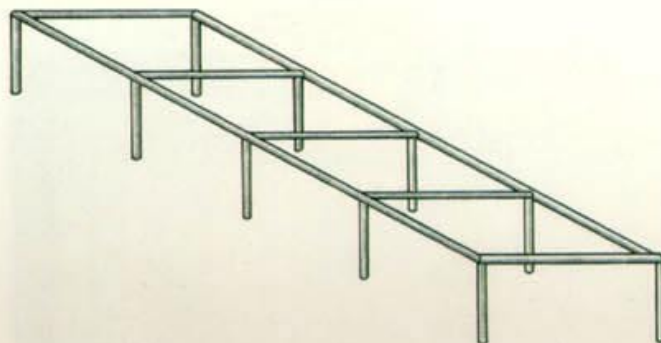
### 4 UNIDAD DE ELIMINACION DEL AGENTE DEPURADOR

Es particularmente importante en el caso de utilizar agentes oxidantes químicos, como el cloro (en cualquiera de sus formas) o el ozono.





**Corte transversal de una piscina de depuración de moluscos.**



**Emparrillado para el sostén de las cestas.**

En el caso de la depuración por cloro, esta unidad consiste en unos depósitos de gran volumen en los que el agua debe circular en movimiento y con cierta agitación durante unas cuatro horas. En el caso de la depuración por ozono se recurre a una torre o escalera de cascadas por las que discurre el agua durante algunos minutos, ya que requiere una agitación y aireación muy grande para eliminar completamente el agente oxidante.

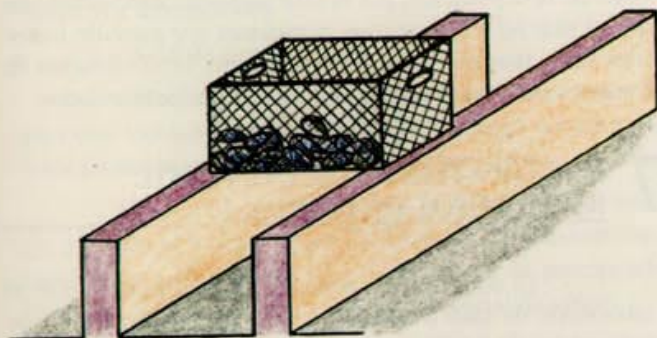
## 5 PISCINAS DE DEPURACION

Las piscinas de depuración ocupan gran parte de las instalaciones. Deben construirse (al igual que practicamente todos los elementos interiores de la depuradora) en materiales sólidos, resistentes a la corrosión marina, de fácil limpieza, superficie lisa, dura, impermeable y resistente y sometidos a iluminación natural o artificial apropiada. El fondo y las paredes han de tener la superficie lisa, dura e impermeable, que resulte facil de limpiar, fregándola o con agua a presión.

Han de tener un sistema de distribución de agua cómodo y de facil acceso y limpieza, con posibilidades de utilizar cualquier piscina en cualquier circunstancia. Normalmente se recurre a un sistema de compuertas manuales.



**Pies de piscinas de depuración.**

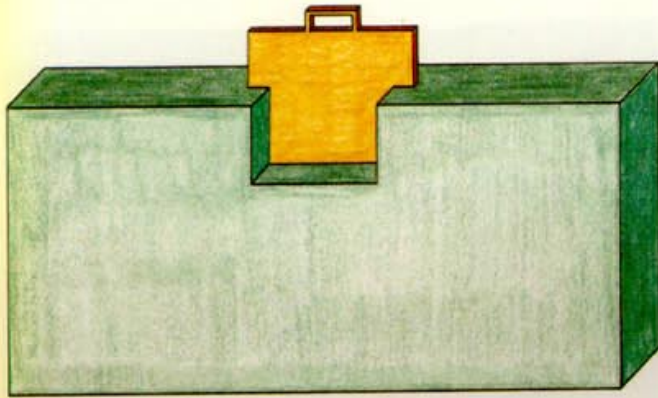


**Disposición de las cestas sobre estribos y alejadas del fondo de la piscina.**

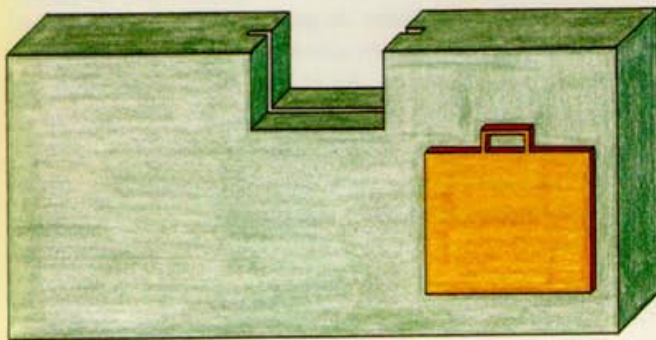


**Disposición de un emparrillado metálico sobre el fondo de la piscina**





**Detalle de compuerta manual cerrada.**



**Detalle de compuerta manual abierta**

Las piscinas no deben ser excesivamente largas, para que los moluscos de las cestas del final no estén recogiendo del agua los desechos de los que se encuentran cerca de la entrada del agua de las piscinas. Su altura, variable, es de aproximadamente 1 m y el ancho también muy variable de hasta 3 m o más.



**Compuerta manual abierta**

La cabecera de la piscina está ocupada, en su parte superior, por el canal de abastecimiento de agua. El fondo, con una pendiente, en sentido longitudinal, del 2% para su mejor vaciado y limpieza. Sobre el fondo se coloca el emparrillado de acero inoxidable que servirá de soporte a las cestas de moluscos o bien, en sustitución del emparrillado, unos tabiques de escasa altura, entre 25-30 cm, llamados "estribos".

Tanto el emparrillado de acero como los estribos de obra, tienen la finalidad de que las cestas de moluscos no entren en contacto con el fondo de la piscina, facilitar la circulación de agua por debajo y evitar que las partículas que se sedimentan afecten de algún modo a los moluscos.

El pie de la piscina suele tener tres paredes. En las dos primeras están, en su parte inferior, los imbornales, que dan al canal general de desagüe. En la primera se encuentra la compuerta de rebose, generalmente cerrada. La segunda, representa el muro de mantenimiento de nivel, con compuerta de fondo utilizada para el vaciado y limpieza de la piscina.

## **6 SISTEMA DE DEPURACION DE VERTIDOS DE LA PROPIA DEPURADORA**

A pesar de que la legislación española determina que los vertidos de las depuradoras de moluscos deben ser tratados antes de su expulsión al mar, esto apenas se lleva a cabo en la depuradoras actuales. Ello es debido a que se acogen a los derechos adquiridos pues cuando se instalaron, este tratamiento previo al vertido no era obligatorio. También se razona que lo que se vierte al mar no es si no agua de mar que ha sido depurada de gérmenes de origen fecal y que solamente aporta productos naturales que se encontraban en el mar en compañía de los moluscos.

Por otro lado, la normativa más reciente de la CEE señala que la distancia entre la toma de agua de mar y los conductos de evacuación de las aguas residuales será la suficiente para evitar contaminación y sólo se autorizará el procedimiento de tratamiento de agua de mar si fuera necesario, una vez que la autoridad competente haya comprobado su eficacia.

Sin embargo, sigue pareciendo razonable la necesidad de depurar los vertidos, lo que si por un lado eleva el coste de la depuración, por el otro garantiza adecuadamente que el mar no recibe nuevas agresiones por parte de industrias cuyo fundamento es, precisamente, la eliminación de riesgos sanitarios provocados por vertidos incontrolados.

## **7 LABORATORIO DE CONTROL MICROBIOLÓGICO**

El control de la depuración se lleva a cabo en el laboratorio de cada depuradora. Este consiste en un laboratorio adaptado a trabajos de microbiología en el cual, según las normas vigentes, debe haber un titulado superior especializado en microbiología.





*La depuradora exige amplios espacios para la recogida y salida de la mercancía.*

Suele ser una sala interior, aislada del resto de las instalaciones, de dimensiones reducidas, con suministro de agua dulce, buena iluminación, suficientes enchufes y lámparas, poyata con fregadero, nevera, armario-almacén de productos de vidrio y químicos, etc.

En cuanto al material específico que debe incorporar, se requieren los siguientes elementos, si bien distintas depuradoras pueden ampliar o reducir este listado en función del sistema de trabajo que tengan establecido.

- Mecheros Bunsen
- Balanza, sensibilidad 0,01 g
- Incubador
- Esterilizador seco de material (ultrasónico, UV, estufa de, al menos, 200°C, etc) y autoclave
- Equipo para filtración al vacío
- Triturador
- Microscopio estereoscópico
- Baño María para obtener temperaturas muy estables, con capacidad para 37°C o 44°C
- pHmetro para los medios de cultivo (se puede emplear papel de tornasol), oxímetro, medidor de salinidad (puede ser un refractómetro o un conductímetro o un densímetro) y termómetros
- Asas de siembra y placas Petri
- Medios de cultivo (hoy se venden deshidratados para casi todos los análisis de diversas marcas comerciales) o los productos para confeccionarlos. Reactivos.
- Tubos de ensayo, tapones para los tubos de ensayo, algodón hidrófugo, papel de filtro, cepillos, escobillas y escobillones. Pipetas de 10 y 1 ml, vasos de precipitado. Probetas, buretas, matraces y demás material de vidrio.
- Tijeras, pinzas, escalpelos o cuchillas y espátulas. Material de lavado, como jabón, esponjas, estropajo, etc.

## 8 ÁREAS DE TRABAJO AUXILIARES

Son áreas de naturaleza muy variada, que engloban desde los vestuarios, duchas, servicios y otras dependencias para los trabajadores al muelle para descarga de los barcos.

Citaremos las características fundamentales de áreas específicas de las depuradoras.

En primer lugar, se encuentra el área de recepción de los moluscos, que abarca desde el muelle hasta el punto de descarga de los camiones y la zona de recepción, ya en el interior de la planta, donde se procede a la primera limpieza externa de los moluscos, "despiñado" (en el caso del mejillón) y clasificación.

Esta última zona requiere disponer de mangueras con agua a presión y suelos no absolutamente lisos pero de fácil limpieza y desagüe, en ligera pendiente hacia los canales de recogida y vertido de las aguas.

En segundo lugar, el área de carga donde se pueda proceder a una carga rápida de los vehículos de transporte, los cuales suelen ser refrigerados para aminorar el metabolismo (y por ello la respiración) de los moluscos y puedan ser transportados en seco durante varias horas, incluso más de un día. Es un área limpia, normalmente exterior pero contigua a la planta a la que se accede por un portalón de dimensiones suficientes para este tipo de labor.

En esta zona de carga, además de las condiciones higiénicas, es muy importante que las temperaturas no sean altas, procurando que no se encuentre en área soleada. Para acelerar la carga de los vehículos, se suelen emplear medios mecánicos, como carretillas elevadoras, cintas transportadoras, etc.



# Actividades

## Autoevaluación

**1** Relacionar el listado de agentes depuradores con los términos de la segunda serie:

|   |              |   |                    |  |  |
|---|--------------|---|--------------------|--|--|
| A | Cloro gas    | 1 | Filtración         |  |  |
| B | Hipoclorito  | 2 | Generador          |  |  |
| C | Ozono        | 3 | Bomba dosificadora |  |  |
| D | Ultravioleta | 4 | Inyección          |  |  |

**2** Señalar para que se emplean los siguientes aparatos e instrumentos y sustancias:

- Baño María
- Refractómetro
- Papel de tornasol
- Asas de siembra
- Ortotoluidina

**3** Con la ayuda del glosario, definir los siguientes términos:

- Imbormal
- Conductivímetro
- Bomba en carga
- Medio de cultivo

## Aplicación

**1** En los Diarios Oficiales de Galicia se suelen publicar los planos generales de las depuradoras, recién autorizadas. Revisar los ejemplares de algunos meses y estudiar 2 o tres planos, comparándolos con lo descrito en este texto.

**2** Señalar los materiales con que podrían recubrirse las paredes interiores y el suelo de las piscinas de depuración. Preguntando en los comercios del ramo elaborar un listado de las marcas que los distintos comerciantes te aconsejan. Tratar de investigar las características físico-químicas de los materiales ofertados por cada marca.

## Conoce tu entorno

**1** Fotocopiar un mapa de carreteras de Galicia que ocupe, aproximadamente un folio. Marcar con un lápiz de colores las zonas que serían más idóneas para la instalación de una depuradora.

**2** Repetir el apartado 1 para otras Comunidades Autónomas.

**3** Preguntando a las entidades administrativas correspondientes, localizar donde se hayan situadas las actuales depuradoras. Superponer sobre el mapa elaborado en los apartados 1 y 2, otro que indique la ubicación de las actuales depuradoras.



# 7

## Dimensionamiento de piscinas y tanques

Lo primero que es necesario definir para proceder al diseño de una depuradora, es la cantidad de kilos de moluscos que se desea depurar diariamente o, al menos, la cantidad máxima de kilos que se desea depurar en 48 horas.

Una vez que ese objetivo de la producción está definido y cuantificado, se procede a realizar los cálculos, teniendo en cuenta la normativa legal vigente.

### **1** CAPACIDAD DE LA DEPURADORA Y DIMENSIONES DE LAS PISCINAS DE ESTABULACION

Una vez definidos los objetivos de la producción, para calcular las dimensiones y capacidad de las piscinas de estabulación, es preciso delimitar previamente el tiempo de uso de dichas piscinas.

La legislación impone que es necesario mantener a los moluscos en depuración un mínimo de 42 horas. Si tenemos en cuenta que las piscinas de depuración tienen que llenarse cuando comienza la depuración de cada partida, y vaciarse y limpiarse cuando termina, ese plazo, se amplía, al menos, a 48 horas.

A partir de este dato se calcula la capacidad de las piscinas de depuración, mediante la siguiente fórmula:

$C = (A \times B) / 2$ , siendo A la cifra en metros cuadrados de las piscinas de depuración, y B la carga en Kgs por metro cuadrado autorizados.

Por imperativos legales las piscinas no podrán estabular más de 30 kg por m<sup>2</sup>, si bien, en algunos casos, a petición del depurador y tras las correspondientes pruebas, Sanidad puede autorizar la depuración a mayor densidad, pero nunca sobrepasar los 45 kg/m<sup>2</sup>.

La razón de limitar el número de kilos por metro cuadrado no se debe a la imposibilidad de depurar a mayor densidad, lo cual es teóricamente posible. Se debe a que si se disponen los moluscos en capas, unos encima de otros, puede llegar el momento en que los de abajo no se puedan abrir, debido al peso de los que tienen encima y, al permanecer cerrados, no se depuran.

### Contenido

1. Dimensionamiento de piscinas de estabulación
2. Cálculos del caudal
3. Dimensionamiento de tanques en los que actúa el agente oxidante
  - 3.1. Cloro
  - 3.2. Ozono



## 2 CALCULO DEL CAUDAL NECESARIO

La normativa impone que será, como mínimo, de 15 metros cúbicos por hora y tonelada de moluscos estabulada.

## 3 DIMENSION DE LOS TANQUES EN LOS QUE ACTUA EL AGENTE OXIDANTE (Cl y ozono) Y SU POSTERIOR ELIMINACIÓN.

### 3.1. CLORO

Si hemos escogido el cloro, sabemos que el tiempo mínimo de contacto del cloro con el agua debe ser de tres a cuatro horas y, a veces, según la turbidez del agua, carga en materia orgánica, temperatura, etc, más. Por esta última razón, se suele calcular, como media, un tiempo de 5 a 6 horas para la eliminación total del agente oxidante.

De este modo, la dimensión (D) de los tanques sobre los que actúa el cloro, se calcula con la siguiente fórmula:

$D = \text{Caudal} \times \text{Tiempo de contacto}$ , o más exactamente:

$$D = \text{Caudal} \times 5 \text{ o } 6 \text{ horas}$$

En este proceso de eliminación del cloro se debe provocar una agitación del agua, procurando que no se estratifique. Para ello se suele dividir en varios estanques en los cuales se va eliminando poco a poco el cloro del

agua, obligándola a pasar de un estanque al otro por arriba (en cascada) y por abajo (mediante ventanas o imbornales), alternativamente.

### 3.2. OZONO

Si hemos escogido el ozono, el tiempo de contacto con el agua no necesita ser tan dilatado como con el cloro. Basta con una dosificación alta de ozono y unos estanques con gran agitación (mucho más brusca que en el caso del cloro). Esta agitación se consigue normalmente, mediante una serie de estanques o torre en cascada, como se ha descrito. En este caso, basta con unos minutos para que el ozono actúe adecuadamente.



*Piscina de depuración.*

## Dimensionamiento de piscina y caudales en un depuradora con cloro con el objetivo de depurar 10.000 kg diarios de moluscos bivalvos

1) Superficie de las piscinas de depuración:

$$S_{pd} = \frac{2 \times \text{Capacidad depuración diaria}}{\text{kg/m}^2 \text{ autorizados}}$$

$$\text{por tanto: } S_{pd} = \frac{2 \times 10.000}{30} = 666 \text{ m}^2$$

2) Caudal necesario:  $C = 15 \text{ m}^3/\text{hora} \times T_m \text{ de molusco estabulada}$   
por tanto:  $\text{Caudal} = 15 \times 20 = 300 \text{ m}^3/\text{hora} = 300.000 \text{ l/h}$

3) Dimensionamiento de los tanques de cloración  
 $\text{Capacidad} = \text{Caudal} \times \text{Tiempo de permanencia}$   
por tanto:  $C_{tc} = 300 \text{ m}^3 \times 4 \text{ horas} = 1.200 \text{ m}^3$

Para mayor seguridad se debe prever un dimensionamiento de 1.500 metros cúbicos, dando 5 horas de tiempo de permanencia del cloro.



# 8

# Funcionamiento y trabajo en una depuradora

## Contenido

1. Recepción
2. Estabulación
3. La depuración
4. Embalado y etiquetado
5. Control de la depuración
  - 5.1. Procedimientos de control. Organismos indicadores
    - 5.1.1. Concepto de organismo indicador
    - 5.1.2. *Escherichia coli*
    - 5.1.3. Coliformes totales
    - 5.1.4. Coliformes fecales
    - 5.1.5. Estreptococos del Grupo D Lancefield
  - 5.2. *Vibrio parahaemolyticus*
  - 5.3. *Salmonella*
  - 5.4. Preparación de muestras de moluscos
    - 5.4.1. Carne sola
    - 5.4.2. Carne más líquido intervalvar.
  - 5.5. Preparación de muestras de agua.
  - 5.6. Análisis
  - 5.7. Criterio microbiológico.
  - 5.8. Métodos analíticos.
    - 5.8.1. Preparación de diluciones decimales.
    - 5.8.2. Investigación y recuento de Coliformes.
    - 5.8.3. Investigación y recuento de *E. coli*.
    - 5.8.4. Análisis de *Enterobacteriaceae* totales.

Los procedimientos de trabajo comprenden la regulación de la corriente de agua para obtener la debida renovación, llenado o vaciado, su distribución, lavado de tanques, depuración del agua de mar, eliminación del agente depurador, depuración de los moluscos y tratamiento de las aguas de salida.

## 1 RECEPCIÓN

Los moluscos que llegan a la depuradora (sea por tierra o por mar) son introducidos en el circuito de depuración, previa limpieza de epifauna, "despiñado" (en el caso del mejillón) y selección de los que alcanzan la talla comercial.

En la zona de recepción se procede, en primer lugar, al "despiñado", limpieza y lavado exterior de los moluscos, con chorros de agua de mar depurada a presión para quitarle los animales adheridos exteriormente y eliminar en lo posible las películas bacterianas exteriormente prendidas a la concha.

El molusco pequeño se retiene y coloca en cajas, sacos o bolsas de malla de red, generalmente de colores rojo o azul para indicar que no está depurado.

## 2 ESTABULACIÓN

Una vez seleccionados y limpios, los moluscos se introducen en las cajas o cestas de depuración, que suelen ser cestas de plástico, que están provistas de aberturas en todas sus caras, así como en el fondo para favorecer, a su través, el intercambio y circulación de agua en todas direcciones.

Tras el llenado de las cestas, se trasladan a las piscinas de depuración, donde se procede a colocarlas sobre el emparrillado de acero inoxidable o los "estribos" de las piscinas, de tal modo que la superficie inferior de las cestas no esté en contacto con el fondo de las piscinas.

Según sea el agente depurador del agua, al mismo tiempo que se están haciendo las faenas anteriores, se dosifica el agente y se mantiene (si es necesario) en el circuito de eliminación.

## 3 LA DEPURACIÓN

Una vez comprobada la calidad del agua y dispuestas las cestas con moluscos en las piscinas de depuración, se procede al llenado de las mismas y, por ello, con el objeto de que los moluscos estén el menor tiempo posible en seco, en los cálculos de diseño se debe prever que el llenado se haga rápido, calculando los caudales de forma generosa.



Tras las consabidas 42 horas en las piscinas de depuración, durante las cuales se toman las muestras necesarias para el control en el laboratorio, se procede a su vaciado, también de la forma lo más rápida posible (de ahí el cálculo de los desagües apropiados para ello). Una vez vacía la piscina, se procede a sacar las cestas, que pasan a la zona de embalaje y etiquetado. Acto seguido las piscinas se limpian enérgicamente, preparándolas para la depuración de un nuevo stock.

## 4 EMBALADO Y ETIQUETADO

Los moluscos depurados, según la normativa vigente, deben ir en envases especiales, generalmente bolsas de malla de red de plástico, si bien, en algunos casos, se emplean envases de madera, porque así lo demanda el mercado.

Todas las partidas deberán llevar una serie de etiquetas que varían según la legislación de las Comunidades Autónomas pero que, en general, deben permitir identificar la depuradora de que proceden, la fecha en que salieron de la misma y la garantía sanitaria de que están depuradas.

Por último se procede a cargar, en el área específica para ello, los moluscos en los vehículos de transporte.



Bivalvos en las cestas de depuración

## 5 CONTROL DE LA DEPURACION

Los controles, como es natural, se hacen mediante análisis microbiológicos, tanto de las aguas como de los moluscos, incluyendo en estos, frecuentemente, el análisis del agua intervalvar.

Sus medidas ya se regularon en España en 1973, por la Orden del 11.4 (BOE nº 91 del 16.4.73) por la que se establecen las bases técnicas y métodos que deberán observar las estaciones depuradoras de moluscos.

En esta orden se determinan los métodos de análisis bacteriológicos de aguas de mar y moluscos, que deberán hacerse sobre *Coliformes*, *Escherichia coli* y *Streptococos fecales*. Estos son, aún hoy, los análisis de rutina que suelen hacerse en todas las depuradoras, si bien, ya son bastantes las depuradoras que incluyen, también, la determinación de *Vibrio parahemolyticus* y de *Salmonella*.

### 5.1. PROCEDIMIENTOS DE CONTROL. ORGANISMOS INDICADORES

Para el control de la depuración, así como para el control microbiológico de las aguas y definir su calidad sanitaria, se emplean, habitualmente, técnicas microbiológicas.

Ya desde principios de siglo, se utilizaron bacterias, además de otros seres vivos vegetales y animales, como organismos indicadores de la calidad de las aguas.

### Normativa española sobre envases de moluscos depurados

1) Los envases de moluscos depurados destinados a la venta serán nuevos, limpios y de un sólo uso.

2) Los envases de mejillones podrán ser cajas de maderas, cestas de mimbre u otro material autorizado por la Dirección General de salud Pública. Las capacidades serán de 1, 2, 5, 10 y 15 kg.

3) Como envases de almejas y berberechos se podrán usar los referidos para mejillones, si bien las capacidades serán de 0, 5, 1 y 2 kg.

4) Para la ostra y el ostión se se podrá utilizar cajas de madera, cestas de mimbre u otro material autorizado por la Dirección General de Salud Pública. Las capacidades serán de 12, 50, 100 y 250 unidades por cajas.





**Piscina de depuración llenándose por la cabezera.**

### 5.1.1. Concepto de "organismo indicador"

En la mayoría de los casos, como ocurre en el análisis de alimentos, no sería práctico intentar el análisis de todos los posibles gérmenes patógenos que pueden encontrarse en una muestra, ya que muchos de esos gérmenes patógenos, especialmente los virus entéricos, son de difícil cultivo y requieren un tiempo demasiado largo para detectarlos con fiabilidad.

Por esta razón, los test de rutina para el dictamen de calidad higiénica de las aguas están orientados a la evaluación rápida de un "organismo indicador", escogido de forma que provea información válida sobre la probable presencia de gérmenes patógenos. Se suele considerar "organismo indicador" a una especie predominante, y que sirve para valorar la calidad sanitaria del producto.

En la mayoría de los casos (aunque no sea siempre enteramente cierto) puede considerarse que un agua que no contenga esos "organismos indicadores" está libre de bacterias patógenas.

### 5.1.2. *Escherichia coli* como organismo indicador

Uno de los organismos indicadores, que se emplea casi universalmente para evaluar la contaminación microbiana fecal de las aguas, es la *Escherichia coli*.

*E. coli* es una bacteria que se encuentra, habitualmente, en el intestino grueso (colon) humano y de los animales homeotermos ("de sangre caliente"), formando parte de la flora intestinal. Su concentración en las heces humanas, se calcula en más de 100 millones de células por gramo de peso de materia seca. Dentro del tracto digestivo no es patógena; al contrario, en esta zona del cuerpo juega un importante papel en la síntesis de vitaminas del grupo B.

Sin embargo, cuando invade otros tejidos del cuerpo humano se vuelve patógeno, bajo dos formas clínicas:

- Los enteropatógenos, que provocan gastroenteritis y diarrea infantil.
- Los uropatógenos, que ocasionan infecciones del tracto urinario.

Cuando en el agua se encuentra abundancia de *E. coli*, - la legislación española, cuantifica el máximo autorizado en 500 por litro - significa que hay una contaminación fecal próxima o reciente, ya que su resistencia en el agua es corta. Aunque en determinado momento, su presencia no sea excesivamente peligrosa, es indicadora de la presencia de otras bacterias que, como la *Salmonella*, sí lo pueden ser.

### 5.1.3. Los coliformes totales (CT) como organismos indicadores

Los Coliformes totales son bacilos de la familia *Enterobacteriaceae*, gram-negativos, aerobios y anaerobios facultativos que fermentan la glucosa, citocromo-oxidasa negativos, reductores de los nitratos a nitritos y crecen en medios con sales biliares. Unos fermentan la lactosa y otros no.

En general, las *Enterobacteriaceae* totales son indicadoras de contaminación y su elevada concentración indica defectos higiénicos en los productos alimenticios.



**Estructura para izado de cestos en una depuradora**





**Izado de cestas en una depuradora.**

#### 5.1.4. Los coliformes fecales (CF) como organismos indicadores

Los coliformes son, por definición, bacterias gram-negativas enterobacteriaceas que fermentan la lactosa en presencia de sales biliares en 24 horas a  $44,5 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$ , con producción de gas y ácido ( $\text{H}_2$ ,  $\text{CO}_2$ ), no necesariamente enteropatógenas. Pertenecen a los géneros *Escherichia* (entre ellos, la *E. coli*, ya comentada), *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, y *Serratia*. Son, a menudo, de origen fecal, pero se reproducen también en las aguas residuales y superficiales. Todos, excepto *E. coli*, pueden vivir como saprofitos libres y como organismos intestinales.

Su habitat fundamental es el tracto intestinal del hombre y otros animales, si bien se pueden encontrar en otros órganos y lugares, como el suelo, cáscara del huevo, etc, y, por supuesto, en los moluscos que viven en aguas contaminadas.

La eficacia de este grupo de "coliformes fecales" como organismos indicadores, está siendo muy discutida por diversos autores, ya que, por un lado, muchos de los gérmenes detectados por los métodos comunes empleados en la industria alimentaria no son de origen fecal (por ejemplo: *Enterobacter*) y, por el otro, dichas pruebas no detectan a veces bacterias fecales patógenas, como la *Salmonella* (lo que obliga a hacer pruebas específicas para estas bacterias).

#### 5.1.5. Estreptococos del grupo D de Lancefield, como indicadores

Son un grupo de Estreptococos, de los cuales el más importante y característico es el *Streptococcus faecalis*. Su determinación se hace, normalmente, como complemento al análisis de coliformes, ya que el número de estreptococos fecales (enterococos), aunque suele ser más

bajo que el de coliformes, es un buen indicador de contaminaciones fecales recientes, si bien su uso como indicador en los alimentos es más discutido.

El género se caracteriza por su forma cocoide, agrupados los individuos por parejas o en cadenas. Son gram-positivos y, casi siempre, inmóviles, no esporulados. Se suelen agrupar antigénicamente según el esquema de Lancefield, mediante las letras del abecedario A, B, C, D ... Al grupo D que, entre otras características, presentan la de poder crecer a una temperatura de  $45 \text{ }^\circ\text{C}$ , pertenecen los estreptococos fecales, entre los que, a su vez, se encuentran los enterococos (*Streptococcus faecalis*, *faecium* y *durans*), que viven generalmente en el intestino humano.

#### 5.2. VIBRIO PARAHAEMOLITICUS

Es frecuente en las aguas marinas y en los moluscos bivalvos. Cuando estos se consumen estando infectados por el *Vibrio*, se producen diarreas y fiebres similares a las de la salmonelosis e, incluso, a las del cólera.

#### 5.3. SALMONELLA

Aunque no es frecuente la presencia de estas bacterias en los moluscos y la realización del test para detectarlas no se incluye dentro de la rutina de las depuradoras, toda Estación debe disponer de material y conocimientos para, en determinado momento, poder llevar a cabo su análisis. La razón de todo ello, se basa en la enorme importancia higiénica de este grupo por ser agente productor de tifus, paratífus y de enteritis.

El género *Salmonella* comprende bacterias con forma de bacilo, no esporuladas, casi siempre móviles, con flagelos peritricos, aerobias y anaerobias facultativas, que



**Bolsas de red para transporte de moluscos frescos.**



fermentan la glucosa con producción de gas, pero no fermentan la lactosa. Se incluyen en la familia de las *Enterobacteriaceae*.

#### 5.4. PREPARACION DE LAS MUESTRAS DE MOLUSCOS PARA EL ANALISIS MICROBIOLÓGICO

Antes de proceder al análisis microbiológico de los moluscos, es preciso preparar adecuadamente las muestras. Puede hacerse de la carne solamente o de la carne más el líquido intervalvar. Tanto en un caso como en el otro todas las operaciones han de hacerse asépticamente y con el material esterilizado.

##### 5.4.1. Carne sola

1. Lavar con agua corriente y cepillar energicamente un número de moluscos, escogidos al azar, suficiente para que el volumen de los cuerpos que al final se obtenga sea al menos de 15 cc. (6 u 8 en el caso de ostra, más en el caso de moluscos pequeños). Escurrir y aplicar externamente alcohol de 70° que se deja secar. Abrir los moluscos con escalpelo o cuchilla esterilizados. Tirar el líquido intervalvar.

2. Sacar los cuerpos y colocarlos en una probeta graduada esteril y añadir el diluyente (Agua de Triptona) para obtener una dilución 1:10.

3. La mezcla se tritura el tiempo necesario para lograr una homogeneización adecuada. Filtrar la mezcla homogeneizada por una gasa estéril, obteniéndose de este modo el caldo final o suspensión madre de la muestra que se va a emplear en todas las determinaciones.

##### 5.4.2. Carne + líquido intervalvar

1. Lavar con agua corriente y cepillar energicamente un número de moluscos, escogidos al azar, suficiente para que el volumen de los cuerpos que al final se obtenga sea al menos de 15 cc. (6 u 8 en el caso de ostra, más en el caso de moluscos pequeños). Escurrir y aplicar externamente alcohol de 70° que se deja secar. Abrir los moluscos con escalpelo o cuchilla esterilizados.

2. Recoger los líquidos intervalvares y la carne en una probeta graduada estéril y añadir el diluyente (Agua de Triptona) para obtener una dilución 1:10, teniendo en cuenta que el líquido intervalvar sirve como parte del líquido de dilución.

3. La mezcla se tritura el tiempo necesario para lograr una homogeneización adecuada. Filtrar la mezcla homogeneizada por una gasa estéril, obteniéndose de este modo el caldo final o suspensión madre de la muestra que se va a emplear en todas las determinaciones.

#### 5.5. PROCEDIMIENTO PARA TOMA DE MUESTRAS DEL AGUA PARA EL ANALISIS BACTERIOLOGICO

Para obtener una muestra representativa y fiable para el análisis bacteriológico del agua problema es preciso cumplir una serie de requisitos.

1. Los frascos de recogida más adecuados son los de vidrio con tapón esmerilado, limpios y esterilizados en autoclave a 120 °C durante 30 minutos o en un horno Pasteur a 180 °C durante dos horas, con una capacidad mínima de 250 ml.

En ciertos casos, como p. ej., cuando se sospeche la presencia en el agua de cloro residual, ozono, etc, antes de la esterilización del frasco se neutralizará su efecto bactericida añadiendo tiosulfato sódico (para un volumen de 250 cc son suficientes 0,2 cc de una solución acuosa al 3% de tiosulfato sódico cristalizado).

2. La toma se realizará alejada de las paredes de piscinas, recipientes, etc.

3. El frasco se introducirá invertido, sumergiéndolo completamente y dándole la vuelta para que el agua penetre facilmente, procurando no llenar totalmente el frasco (el volumen a tomar dependerá de los análisis bacteriológicos que se pretendan).

4. Los frascos se precintarán y rotularán con tinta resistente al agua, garantizando su preservación y rápida identificación. Una vez recogida, precintada y rotulada la muestra, se procederá al etiquetado, señalando: origen de la muestra, referencia, emplazamiento del muestreo, fecha y hora, nombre del muestreador y todos aquellos datos que se consideren necesarios.

5. La muestra debe analizarse cuanto antes y, en cualquier caso, no debe sobrepasar de seis horas el tiempo transcurrido entre el muestreo y el análisis. En ciertos casos, para mantener más tiempo la muestra sin analizar, podrá refrigerarse la muestra y mantenerla a unos 4 °C.

#### 5.6. ANALISIS

Los análisis más habituales en un laboratorio de una Estación depuradora de moluscos son:

- Colimetría. Contaje de coliformes
- Identificación y contaje de *Escherichia coli*
- Estreptometría. Detección de *Streptococcus* grupo D de Lancefield.

Ya hemos citado que, además de estos, se suelen hacer con cierta frecuencia (algunas depuradoras ya los incluyen en los test de rutina) otros como:

- *Vibrio parahaemolyticus*
- *Salmonella - Shigella*





Diferentes modelos empleados en el embalaje de moluscos bivalvos.

## 5.7. CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS

La Orden del 31 de mayo de 1985 (BOE nº 137 del 8.06.85) por la que se aprueba la norma de calidad para los moluscos bivalvos depurados, establece el siguiente criterio:

|  | MAXIMO                  |
|--|-------------------------|
| Recuento total aerobios vivificables (20 °C, 5 días) | 1 a 10 <sup>3</sup> /ml |
| <i>Escherichia coli</i>                              | 500 / litro             |
| <i>Salmonella</i>                                    | Ausencia en 25 ml.      |
| Streptococcus del grupo D Lancefield                 | 1 a 10 <sup>2</sup> /g  |



Con posterioridad a esta fecha, la Directiva de la CEE del 15.07.91 (91/492/CEE), publicada en el DOCE nº L 268, establece un nuevo criterio, que pronto será de obligado cumplimiento en nuestro país. Dice:

"Los moluscos bivalvos vivos destinados al consumo humano inmediato tendrán menos de 300 coliformes fecales o menos de 230 *E. coli* por cada 100 g de carne de molusco y líquido intervalvar en una prueba NMP (NPP) en la que se utilicen 5 tubos y 3 diluciones o en cualquier otro método de análisis bacteriológico de precisión equivalente demostrada; no habrá *Salmonella* en 25 g de carne de molusco. A falta de métodos habituales de detección de virus y normas virológicas, el control sanitario se basará en el recuento de bacterias fecales".

## 5.8. CRITERIOS ANALITICOS

Ya hemos citado que los métodos de análisis se detallan en la Orden del 11.4.73 (BOE nº 91 del 16.04.73) por la que se establecen las bases técnicas y métodos que deberán observar las estaciones depuradoras de moluscos, haciendo recuento de Coliformes, *E. coli* y *Estreptococos* fecales. Sin embargo, en la actualidad pueden utilizarse otros métodos de eficacia equivalente suficientemente demostrada, además de reforzarse la tendencia a incluir análisis de otros agentes, tales como *Salmonella-Shigella*, *Vibrio parahaemolyticus* y otros.

### 5.8.1. Preparación de diluciones decimales a partir de una muestra

Esta técnica es de uso muy frecuente en todos los laboratorios de análisis microbiológico. Tiene por objeto, como su nombre indica, efectuar diluciones progresivas de una muestra en una serie decreciente de concentraciones:  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ , etc.

Como material y reactivos se requiere: Agitador excéntrico, autoclave, balanza y accesorios, matraces Erlenmeyer, pipetas estériles de 10 y 1 ml, pHmetro, triturador homogeneizador, tubos de ensayo (16 x 160 mm) y Agua de Triptona (TW), para cuya preparación se necesitan 10 g de triptona y 5 g de cloruro sódico que se mezclan y disuelven en 1.000 ml de agua destilada, ajustando el pH a 7,2.

1. Distribuir el agua de triptona a razón de 9 ml por tubo de ensayo. Autoclavar a 120 °C durante 15 minutos (el número de tubos será equivalente al número de diluciones que se quiere obtener).

2. Pesar una parte suficiente de la muestra. Multiplicar el peso obtenido por 9; el resultado obtenido equivale al volumen de diluyente, expresado en mililitros, que es necesario añadir para obtener la primera dilución 1:10.

3. Someter la mezcla (muestra + diluyente) a homogeneización y trituración, con un triturador de paletas

o un triturador-homogeneizador, para formar la suspensión madre y primera dilución de la serie 1:10.

4. Para obtener la segunda dilución 1:100, transferir con la pipeta 1 ml de la suspensión madre a uno de los tubos de ensayo con 9 ml de TW y someterlo a la acción del agitador excéntrico durante 30 segundos. Retirar la pipeta usada.

5. La tercera dilución 1:1.000, se obtiene recogiendo e una nueva pipeta estéril 1 ml de la dilución anterior 1:100 y transfiriéndola a un nuevo tubo de ensayo con 9 ml de TW que, como en el caso anterior, se someterá durante 30 segundos a la acción del agitador excéntrico.

6. Repetir la operación hasta lograr las diluciones consideradas necesarias: 1:10, 1:100, 1:1.000, 1:10.000, etc.

7. Mantener los tubos en el frigorífico hasta el comienzo del análisis teniendo cuidado de que el tiempo que ha de transcurrir entre la preparación de la serie decimal y el inicio del análisis no ha de sobrepasar las dos horas.

### 5.8.2. Investigación y conteo de Coliformes totales en medio líquido.

La investigación y recuento de los coliformes puede hacerse en medio líquido, empleando como medio de cultivo el Caldo lactosado biliado verde brillante (CLBVB), o en medio sólido, empleando como medio selectivo el Agar biliado neutro cristal violeta (ABNCV). En este texto describiremos la técnica de conteo en medio líquido.

1. Preparar el medio de cultivo CLBVB (se puede adquirir en el comercio), para lo cual se disuelven 10 g de peptona, 10 g de lactosa, 20 g de bilis de buey y 0,0133 g de verde brillante en 1.000 ml de agua destilada. Se ajusta el pH a 7,4 y se distribuye a razón de 10 ml por tubo de ensayo con campana Durham. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

2. Verter en 9 tubos 10 ml de CLBVB y situarlos en una gradilla en tres series de tres tubos cada una. En cada uno tubo de la 1ª serie, verter 1 ml de la dilución de la muestra al 1:10. En los tubos de la 2ª serie, verter 1 ml de la muestra al 1:100 y en los tubos de la 3ª serie verter 1 ml de la muestra al 1:1.000.

3. Incubar los 9 tubos a  $31 \pm 1$  °C, haciendo lecturas a las 24 y 48 horas. La reacción es positiva cuando aparece gas en la campana Durham, por lo menos en 1/10 parte de su volumen. Con el número de tubos positivos, se obtiene el recuento por gramo o mililitro aplicando la Tabla del Número Más Probable (NMP) para tres series de tres tubos cada una.



**Tabla del NMP por g ó ml para 3 series de 3 tubos con 10 ml. de medio, sembrando 1 ml. de dilución 1:10, 1:100 y 1:1.000**

| 3 tubos |       |         | NMP   |
|---------|-------|---------|-------|
| 1:10    | 1:100 | 1:1.000 |       |
| 0       | 0     | 0       | ≤3    |
| 0       | 0     | 1       | 3     |
| 0       | 1     | 0       | 3     |
| 1       | 0     | 0       | 4     |
| 1       | 0     | 1       | 7     |
| 1       | 1     | 0       | 7     |
| 1       | 1     | 1       | 11    |
| 1       | 2     | 0       | 11    |
| 2       | 0     | 0       | 9     |
| 2       | 0     | 1       | 14    |
| 2       | 1     | 0       | 15    |
| 2       | 1     | 1       | 20    |
| 2       | 2     | 0       | 21    |
| 2       | 2     | 1       | 28    |
| 3       | 0     | 0       | 23    |
| 3       | 0     | 1       | 39    |
| 3       | 0     | 2       | 64    |
| 3       | 1     | 0       | 43    |
| 3       | 1     | 1       | 75    |
| 3       | 1     | 2       | 120   |
| 3       | 2     | 0       | 93    |
| 3       | 2     | 1       | 150   |
| 3       | 2     | 2       | 210   |
| 3       | 3     | 0       | 240   |
| 3       | 3     | 1       | 480   |
| 3       | 3     | 2       | 1100  |
| 3       | 3     | 3       | ≥2400 |

### 5.8.3. Investigación y conteo de *Escherichia coli*

Se parte de los resultados obtenidos en la investigación y recuento de coliformes, subcultivando todos los tubos que en esa investigación hayan dado resultado positivo, con producción de gas en las campanas Durham. Para conseguir resultados fiables necesitaremos Agua de Triptona (TW) (ver el apartado de obtención de diluciones decimales), CLBVB (ver Investigación de Coliformes), Agar Levine y reactivo de Kovacs.

El medio Agar Levine se prepara disolviendo por calentamiento 10 g de peptona, 10 g de lactosa, 2 g de fosfato dipotásico, 0,40 g de eosina, 0,065 g de azul de metileno y 15 g de agar en 1.000 ml de agua destilada. El pH de ajusta a 7,1 y, después de distribuir el medio, se autoclava a 121 °C durante 15 minutos para preparar las placas Petri de 90 mm.

El reactivo de Kovacs, se obtiene disolviendo 5 g de Paradimetil-amino-benzaldehído en 75 ml de alcohol amílico y calentando a 60 °C en baño María. Se deja enfriar y se añaden, gota a gota, 25 ml de ácido clorhídrico puro.

El líquido resultante ha de guardarse en frasco tapado, en la oscuridad y colocado en el frigorífico hasta el momento de ser usado.

1. Preparar los tubos de ensayo de 16 x 160 mm con campana Durham, vertiendo en cada uno 10 ml de CLBVB. Con el asa de siembra se procede al subcultivo de los tubos que han dado resultado positivo en la prueba de coliformes en estos otros tubos así preparados. Incubar en baño María a  $44,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ , con lectura de producción de gas a las 24 y 48 horas.

2. A partir de los tubos con respuesta positiva en el apartado 2, se hacen siembras sobre placas Petri con Agar Levine. Incubar a  $44,5 \pm 1^\circ\text{C}$  con lecturas a 24 y 48 horas. Se consideran colonias se *E. coli*, las de 2 a 3 mm de diámetro, planas o muy ligeramente cóncavas, con un centro oscuro, casi negro, que ocupa las tres cuartas partes de la colonia.

3. Realizar la prueba del indol, para lo cual se siembran 1 o 2 colonias de cada placa positiva en tubos con Agua de triptona, incubándolos durante 24 horas al baño María a  $44,5^\circ\text{C}$ . Al cabo de este tiempo, se añaden a cada tubo 0,5 ml del reactivo de Kovacs. Los tubos positivos presentarán un anillo rojo bermellón en la superficie del medio, mientras que los tubos negativos presentarán anillo amarillento.

4. Cuando coinciden las tres pruebas anteriores, se hace el recuento aplicando la tabla del NMP.

### 5.8.4. Análisis de *Enterobacteriaceae* totales

Se puede hacer el recuento de *Enterobacteriaceae* totales en medio líquido y sólido. Nosotros describiremos la técnica para el conteo en medio líquido. Para ello, necesitamos preparar los siguientes medios: Caldo triptona soja (CTS), Caldo EE de Mossel simple (CEEEdMs), Agar biliar rojo violeta glucosa (ABrvG), Agar nutritivo de recuento (ANR), Reactivo para la prueba citocromo-oxidasa y Medio Kligler Iron Agar (KIA). Aunque prácticamente todos los medios pueden adquirirse en el mercado, pasamos a describir su preparación.

#### CALDO DE TRIPTONA SOJA (CTS):

Disolver calentando 17 g de triptona, 3 g de soja, 2,50 g de dextrosa, 5 g de ClNa y 2,50 g de fosfato dipotásico en 1.000 ml de agua destilada. Ajustar pH a 7,3 y distribuirlo en pequeños matraces a razón de 9 ml. Autoclavar a 121 °C durante 15 minutos.

#### CALDO EE DE MOSSEL SIMPLE (CEEEdMs):

Disolver calentando 10 g de peptona, 6,50 g de fosfato sódico, 5 g de dextrosa, 2 g de fosfato potásico, 20 g de bilis de buey y 0,125 g de verde brillante en 1.000 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 7,2 y distribuirlo en tubos de ensayo a razón de 10 ml en cada uno. Calentar al baño María a 100°C durante 20 minutos. Enfriar inmediatamente con agua del grifo.



#### AGAR BILIADO ROJO VIOLETA GLUCOSA (ABrvG):

Disolver, calentando hasta ebullición, 3 g de extracto de levadura, 7 g de peptona, 5 g de ClNa, 1,50 g de sales biliares, 10 g de glucosa, 0,03 g de rojo neutro, 0,002 g de cristal violeta y 12 g de Agar en 1.000 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 7,3 y verterlo en las placas Petri.

#### AGAR NUTRITIVO DE RECUENTO (ANR):

Disolver por calentamiento 5 g de triptona, 2,50 g de extracto de levadura, 1 g de dextrosa y 12 g de Agar en 1.000 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 7 y distribuir el medio en los tubos. Autoclavar a 121 °C durante 15 minutos.

#### REACTIVO PARA LA PRUEBA DE CITOCROMO-OXIDASA

Disolver 100 g de Clorhidrato de N-dimetil-para-fenilendiamina en 100 ml de agua destilada. Esta disolución ha de emplearse recién hecha.

#### MEDIO KLIGER IRON AGAR (KIA)

Disolver calentando 3 g de extracto de carne, 3 g de extracto de levadura, 20 g de peptona, 5 g de ClNa, 0,30 g de sulfato ferroso, 0,30 g de tiosulfato sódico, 10 g de lactosa, 1 g de glucosa, 0,05 g de rojo fenol y 15 g de agar en 1.000 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 7,4 y distribuirlo en los tubos de ensayo. Autoclavar a 121 °C durante 15 minutos. Dejar solidificar en posición inclinada. Este medio puede conservarse 5 o 6 días.

Una vez todos los medios y material preparados, se seguirá la secuencia siguiente:

1. Se enriquece la primera dilución decimal 1:10 (suspensión madre) de la muestra con CTS, para lo cual se mantiene la suspensión durante 2 horas en un recipiente de vidrio estéril a temperatura ambiente, agitando cada cierto tiempo. Se hacen las diluciones 1:100 y 1:1.000, utilizando como diluyente CTS.

2. En una gradilla se colocan 15 tubos en 3 series de 5 tubos cada una, en los que se vierten 10 ml de CEEdMs.

3. En la primera serie se añade a cada tubo 1 ml de la dilución de la muestra 1:10. En la segunda serie, 1 ml de la dilución 1:100 y en la tercera serie, 1 ml de la dilución 1:1.000. Se agitan todos los tubos e incuban a 37 °C durante 24 horas.

4. De los tubos en que se presente crecimiento bacteriano, previa agitación para mezclar bien el contenido, se siembra con asa de cultivo la superficie de unas placas Petri con el medio ABrvG. Incubar a 37 °C durante 24 horas. La presencia de *Enterobacteriaceae* se hace notar por un viraje

al rojo y por la precipitación de sales biliares alrededor de las colonias. También se consideran *Enterobacteriaceae* las colonias de color violeta con halo también violeta.

5. Para confirmar, sembrar dos colonias crecidas en el medio ABrvG, sobre ANR. Incubar durante 24 horas a 37 °C.

6. En una placa Petri vacía colocar un trozo de papel Whatman (unos 5 cm<sup>2</sup>) y en su centro depositar tres gotas de Reactivo para la prueba de citocromo-oxidasa. Tomar una pequeña porción del cultivo sobre ANR y extenderla en 4-5 mm sobre el papel Whatman. Recordando que las *Enterobacteriaceae* son citocromo-oxidasa negativas, la reacción positiva se manifiesta por la presencia de una coloración violeta oscura en toda la extensión del cultivo.

7. Sembrar la cepa a estudio, procedente del cultivo sobre ANR, en los tubos de ensayo con medio agar Kligler. Para ello emplearemos el asa de cultivo, sembrando por diseminación en la superficie y por picadura en el fondo. Incubar en estufa a 37 °C y hacer la lectura a las 24 horas:

- a) Fermentación de glucosa: fondo amarillo.
- b) No fermentación de glucosa: fondo rojo grosella
- c) Fermentación de lactosa: superficie inclinada amarilla.
- d) No fermentación de lactosa: superficie rojo grosella.
- e) Gas: presencia de burbujas.
- f) Producción de SH<sub>2</sub>: la zona que separa el fondo de la superficie inclinada o toda la parte inferior del tubo, ennegrecen.

#### Interpretación de prueba sobre agar kligler (según M<sup>o</sup> R. Pascual)

| MICROORGANISMO                | FONDO  | SUPERFICIE | SH <sub>2</sub> |
|-------------------------------|--------|------------|-----------------|
| <i>Enerobacter aerogenes</i>  | AG     | A          | -               |
| <i>Enterobacter cloacae</i>   | AG     | A          | -               |
| <i>Escherichia coli</i>       | AG     | SC         | +               |
| <i>Proteus morgani</i>        | A o AG | SC         | -               |
| <i>Shigella sonnei</i>        | A      | SC         | -               |
| <i>Salmonella typhi</i>       | A      | SC o ALC   | +               |
| <i>Salmonella typhimurium</i> | AG     | SC o ALC   | +               |
| <i>Salmonella enteritidis</i> | AG     | SC o ALC   | +               |

AG= Formación de ácido y gas (amarillo y burbujas), A= Formación de ácido (amarillo), SC= sin cambios, ALC= alcalino (rojo), + = Producción SH<sub>2</sub> (ennegrecimiento), - = Sin ennegrecimiento.

8. Para calcular los resultados se recurre a la Tabla de NMP de tres series de 5 tubos, sobre los resultados obtenidos en el cultivo sobre CEEdMs, los citocromo-oxidasa negativos y el cultivo sobre agar Kligler.



Tabla del NMP por g ó ml para 3 series de 5 tubos con 10 ml. de medio, sembrando 1 ml de dilución 1:10, 1:100 y 1:1.000

| 5 tubos 1 ml NMP |       |         |    | 5 tubos 1 ml NMP |       |         |       |
|------------------|-------|---------|----|------------------|-------|---------|-------|
| 1:10             | 1:100 | 1:1.000 |    | 1:10             | 1:100 | 1:1.000 |       |
| 0                | 0     | 0       | 0  | 4                | 0     | 0       | 13    |
| 0                | 0     | 1       | 2  | 4                | 0     | 1       | 17    |
| 0                | 0     | 2       | 4  | 4                | 0     | 2       | 21    |
| 0                | 1     | 0       | 2  | 4                | 0     | 3       | 25    |
| 0                | 1     | 1       | 4  | 4                | 1     | 0       | 17    |
| 0                | 1     | 2       | 6  | 4                | 1     | 1       | 21    |
| 0                | 2     | 0       | 4  | 4                | 1     | 2       | 26    |
| 0                | 2     | 1       | 6  | 4                | 2     | 0       | 22    |
| 0                | 3     | 0       | 6  | 4                | 2     | 1       | 26    |
| 1                | 0     | 0       | 2  | 4                | 2     | 2       | 32    |
| 1                | 0     | 1       | 4  | 4                | 3     | 0       | 27    |
| 1                | 0     | 2       | 5  | 4                | 3     | 1       | 33    |
| 1                | 0     | 3       | 8  | 4                | 3     | 2       | 39    |
| 1                | 1     | 0       | 4  | 4                | 4     | 0       | 34    |
| 1                | 1     | 1       | 6  | 4                | 4     | 1       | 40    |
| 1                | 1     | 2       | 6  | 4                | 5     | 0       | 41    |
| 1                | 2     | 0       | 6  | 4                | 5     | 1       | 48    |
| 1                | 2     | 1       | 8  | 5                | 0     | 0       | 23    |
| 1                | 2     | 2       | 10 | 5                | 0     | 1       | 31    |
| 1                | 3     | 0       | 8  | 5                | 0     | 2       | 43    |
| 1                | 3     | 1       | 10 | 5                | 0     | 3       | 58    |
| 1                | 4     | 0       | 11 | 5                | 0     | 4       | 76    |
| 2                | 0     | 0       | 5  | 5                | 1     | 0       | 33    |
| 2                | 0     | 1       | 7  | 5                | 1     | 1       | 46    |
| 2                | 0     | 2       | 9  | 5                | 1     | 2       | 63    |
| 2                | 0     | 3       | 12 | 5                | 1     | 3       | 84    |
| 2                | 1     | 0       | 7  | 5                | 2     | 0       | 49    |
| 2                | 1     | 1       | 9  | 5                | 2     | 1       | 70    |
| 2                | 1     | 2       | 12 | 5                | 2     | 2       | 94    |
| 2                | 2     | 0       | 9  | 5                | 2     | 3       | 120   |
| 2                | 2     | 1       | 12 | 5                | 2     | 4       | 148   |
| 2                | 2     | 2       | 24 | 5                | 2     | 5       | 177   |
| 2                | 3     | 0       | 12 | 5                | 3     | 0       | 79    |
| 2                | 3     | 1       | 14 | 5                | 3     | 1       | 109   |
| 2                | 4     | 0       | 15 | 5                | 3     | 2       | 141   |
| 3                | 0     | 0       | 8  | 5                | 3     | 3       | 175   |
| 3                | 0     | 1       | 11 | 5                | 3     | 4       | 212   |
| 3                | 0     | 2       | 13 | 5                | 3     | 5       | 253   |
| 3                | 1     | 0       | 11 | 5                | 4     | 0       | 130   |
| 3                | 1     | 1       | 14 | 5                | 4     | 1       | 172   |
| 3                | 1     | 2       | 17 | 5                | 4     | 2       | 221   |
| 3                | 1     | 3       | 20 | 5                | 4     | 3       | 278   |
| 3                | 2     | 0       | 14 | 5                | 4     | 4       | 345   |
| 3                | 2     | 1       | 17 | 5                | 4     | 5       | 426   |
| 3                | 2     | 2       | 20 | 5                | 5     | 0       | 240   |
| 3                | 3     | 0       | 17 | 5                | 5     | 1       | 348   |
| 3                | 3     | 1       | 21 | 5                | 5     | 2       | 542   |
| 3                | 4     | 0       | 21 | 5                | 5     | 3       | 920   |
| 3                | 4     | 1       | 24 | 5                | 5     | 4       | 1600  |
| 3                | 5     | 0       | 25 | 5                | 5     | 5       | ≤1600 |

| Moluscos de depuración obligatoria (Galicia)      |               |
|---|---------------|
| <i>Mytilus edulis</i> (Linné, 1767)               | Mejillón      |
| <i>Mytilus galloprovincialis</i> (Philippi, 1844) | Mejillón      |
| <i>Ostrea edulis</i> (Linné, 1767)                | Ostra         |
| <i>Crassostrea angulata</i> (Lamarck, 1822)       | Ostión        |
| <i>Venerupis decussata</i> (Linné, 1767)          | Almeja fina   |
| <i>Venerupis pullastra</i> (Montagu, 1803)        | Almeja babosa |
| <i>Cerastoderma edule</i> (Linné, 1767)           | Berberecho    |

## Conceptos y normas aplicables en las estaciones depuradoras

| CONCEPTO   | NORMA   |
|--|---|
| Caudal mínimo  | 15 m <sup>3</sup> / hora y Tm de moluscos   |
| Toma de agua de mar  | 2,5 m por debajo de la bajamar viva equinocial  |
| Pendiente del fondo de las piscinas de depuración  | 2%  |
| Carga máx./piscina   | 30 kg/m <sup>2</sup> incrementable hasta 45 kg  |
| Distancia mínima entre punto de toma y punto de vertido  | 250 mts   |
| Tratamiento vertido  | Eliminación de flora patógena   |
| Capacidad máxima   | Cap= (AxB) / 2, siendo A los m <sup>2</sup> de la piscina y B la carga en kg por m <sup>2</sup> autorizados   |
| Tiempo mínimo de depuración  | 42 horas  |
| Libros registro día  | Análisis de agua<br>Análisis de moluscos<br>Control de etiquetas y depuración   |
| Etiquetas  | Identificación el producto<br>Detalla el peso de contenido neto<br>Detalla número de piezas, en su caso<br>Fecha de caducidad<br>Identificación de la empresa<br>Ubicación de la empresa<br>Identificación del lote o partida |
| Material, rotulación de etiquetas  | El material y la rotulación deben durar al menos el tiempo máximo de caducidad (5 días) y ser atóxicos.   |
| PROHIBICION GENERAL DE DEPURAR EN SACOS<br>OBLIGATORIEDAD DE DISPONER DE UN LABORATORIO DE CONTROL<br>PROHIBICIONES SOBRE USO DEL TABACO EN LAS FAENAS |   |



## Términos del texto recogidos en el glosario

### A

Abono  
Acondicionamiento  
Aire acondicionado  
Aireación  
Alga  
Aminoácido  
Antibiótico  
Arena  
Autofecundación

### B

Bacteria  
Banco cultivado  
Batea  
Biometría  
Biosíntesis  
Bivalvo  
Bonba de vacío  
Bomba dosificadora  
Branquias

### C

Cadena trófica  
Cal  
Caloría  
Cámara de recuento  
Carcasa  
Categoría  
Categoría taxonómica  
Caudal  
Cavidad paleal  
Cemento  
Cepa  
Cesta  
Cigoto  
Cilios  
Citoplasma  
Clave  
Cloro activo  
Colector  
Concha  
Contador Coulter  
Criadero  
Cubreobjetos  
CH  
Charnela

### D

Desinfección  
Desove

Detritos  
Diatomea  
Dieta  
Digestibilidad  
Digestión  
Dilución  
Diseccción

### E

Eclosión  
Engorde  
Epibionte  
Especie  
Espectro  
Esperma  
Espermatozoides  
Estabulación  
Esterilización  
Estuario  
Excreción

### F

Familia  
Fango  
Fecundación  
Fertilidad  
Fibra de vidrio  
Fijación  
Filtración  
Filtración biológica  
Filtración mecánica  
Filtración química  
Filtrador  
Filtro  
Filtro de arena  
Filtro de vacío  
Flujo  
Fotosíntesis

### G

Gameto  
Gametogénesis  
Género  
Germen  
Glándula  
Glucido  
Gónada  
Gonoducto  
Gregario

### H

Hábitat

Heces  
Hermafrodita  
Huevo

### I

Incubación  
Incubador  
Inducción  
Infección  
Infestación  
Ingestión  
Inoculación  
Inóculo  
Intercambiador  
Intrmareal

### L

Larva  
Lejía  
Liofilización  
Liposoluble

### M

Maduración  
Malla  
Manto  
Matraz erlenmeyer  
Matríz  
Medio de cultivo  
Medio de enriquecimiento  
Metabolismo  
Metabolito  
Metamorfosis  
Microscopio  
Microtomo  
Morfología  
Mucosa  
Muestra  
Muestreo  
Mufla  
Multiespecífico

### N

Natante  
Nivel trófico  
Nutriente

### O

Ojo  
Oligoelemento