

# Desarrollo de un criterio aplicable a la vigilancia de la calidad bacteriológica de las aguas en las zonas de producción de moluscos de la bahía de Santander

A. Puente, J. A. Juanes, J. A. Revilla, C. Álvarez, J. Gómez y A. García

Departamento de Ciencias y Técnicas del Agua y del Medio Ambiente. Universidad de Cantabria. Avda. de los Castros, s/n. E-39005 Santander (Cantabria), España. Correo electrónico: araceli@emisarios.unican.es

Recibido en julio de 2001. Aceptado en febrero de 2002.

## RESUMEN

La normativa de la Unión Europea (Directiva 79/923/CEE) no establece ningún criterio de calidad referente a la concentración de indicadores bacteriológicos en el agua para la vigilancia ambiental de las zonas de producción de moluscos. En este estudio se planteó el análisis del factor de bioconcentración de coliformes fecales en los moluscos. Los resultados obtenidos permiten estimar un factor medio de bioconcentración de 10, a partir del cual se desarrolla un sistema complementario de control de la calidad bacteriológica de las aguas en el entorno de las zonas de producción. Tomando como base estos resultados, se propone una adaptación de los programas de vigilancia y control ambiental establecidos en la normativa para estas zonas.

**Palabras clave:** Bioconcentración, coliformes, *Tapes decussatus*.

## ABSTRACT

*Development of criteria applicable to bacteriological quality control of the waters in mollusc producing areas of Santander Bay*

*European Union regulations (Directive 79/923/CEE) do not establish any quality criteria guidelines with regard to the concentration of bacteriological indicators in the water for monitoring shellfish growing areas. In the present study the bioconcentration factor of fecal coliforms in molluscs is analysed. With these results, we have estimated an average bioconcentration factor of 10. Based on these values, we propose the establishment of a complementary bacteriological water quality criteria for shellfish growing areas, and modifications in their regulatory environmental monitoring programmes.*

**Keywords:** Bioconcentration, coliforms, *Tapes decussatus*.

## INTRODUCCIÓN

La normativa sobre las zonas de producción de moluscos (Directiva 79/923/CEE del Consejo, de 30 de octubre de 1979; Real Decreto 345/1993, de 5 de marzo) contempla, como indicador de calidad y criterio determinante para la clasificación de las zonas de producción de moluscos, la concentra-

ción de coliformes fecales (CF) en el interior de los organismos (carne y líquido intervalvar). Este criterio, establecido con el objeto de garantizar la salud del consumidor, plantea un problema para su aplicación en estudios predictivos sobre la evolución de la calidad bacteriológica de las zonas de producción frente a posibles episodios de vertido, principalmente en lo que respecta a las aguas resi-

duales urbanas. En este tipo de estudios, la consideración de la concentración de CF en el interior de los moluscos como criterio de calidad implicaría la necesidad de desarrollar modelos de calidad muy sofisticados que simularan, además de la dilución, dispersión e inactivación de los indicadores fecales, la dinámica nutricional de los bivalvos.

Este hecho conduce a la necesidad de abordar otro tipo de planteamientos metodológicos que permitan estimar y relacionar la calidad de las aguas en una determinada zona con la salubridad de los productos marisqueros que pudieran extraerse de ella. En este sentido, hay que indicar que, en el caso particular de la normativa de referencia, no se han propuesto limitaciones a la calidad de las aguas ni se han planteado los rangos teóricos de concentraciones de indicadores bacteriológicos en el agua que permitan predecir, con cierta probabilidad, la no superación de los criterios de calidad vigentes sobre indicadores bacteriológicos en la carne de los moluscos.

Por otra parte, las fluctuaciones de las cargas contaminantes procedentes de los vertidos y las continuas variaciones de las condiciones ambientales, unidas a las fuentes de variación que introducen el muestreo y las técnicas de análisis bacteriológicos, determinan la necesidad de tomar un número relativamente elevado de muestras para poder valorar con rigor la calidad de las zonas de producción de moluscos (Bonde, 1977). No obstante, tanto la toma de muestras como los procedimientos analíticos son menos laboriosos, a la vez que más precisos, en el agua que en los moluscos, por lo que la existencia de un criterio de calidad de contaminación fecal en el medio acuático facilitaría la realización de programas de vigilancia más intensos.

Considerando esta problemática, y partiendo de la probada existencia de una relación entre la contaminación fecal del entorno acuático y la que presentan los moluscos bivalvos (Cabelli y Hefferman, 1970; Plusquellec, Beucher y Le Gal, 1983; Beucher *et al.*, 1989; Guillaud, Le Saux y Pommepuy, 1997), se planteó la obtención de una relación estadística entre las concentraciones de CF en el agua y en el interior de los moluscos que sirviera de base para establecer un criterio de calidad bacteriológica en las zonas de producción de moluscos de la bahía de Santander. Dicho criterio permitiría establecer un procedimiento preliminar de control de la calidad bacteriológica, aplicable, por un lado, al estudio de las afecciones de los vertidos de aguas residuales y,

por otro, al desarrollo de un sistema de vigilancia complementario al que se desarrolla actualmente en las zonas de producción de la Bahía.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización del estudio se llevaron a cabo campañas de campo en tres zonas de la bahía de Santander (Cantabria): pantalán de Calatrava, ensenada de San Bartolomé y dársena sur de Raos. Las dos primeras zonas están situadas en las zonas intermareales del sur de la Bahía y se corresponden con zonas de producción de moluscos (Orden de 20 de diciembre de 1993), mientras que la última está localizada en las proximidades del área portuaria y en principio está más afectada por los vertidos de aguas residuales que las dos restantes (figura 1).

Las campañas se llevaron a cabo durante tres días consecutivos en septiembre de 1998, tomando diariamente 5 muestras de agua y 5 de almeja fina

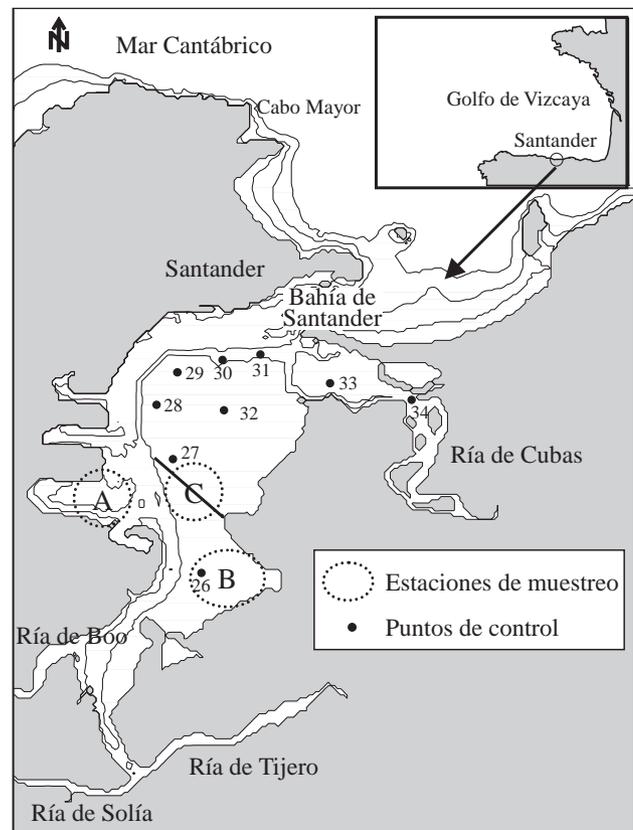


Figura 1. Localización de las zonas de estudio en la bahía de Santander (A: dársena sur de Raos, B: ensenada de San Bartolomé, C: pantalán de Calatrava) y de los puntos de control considerados para el análisis de la contaminación bacteriológica en la situación de saneamiento futura.

*Tapes decussatus* Linnaeus, 1758 en cada una de las tres zonas de estudio, lo que representa un total de 45 muestras de agua y 45 de moluscos. Los moluscos se recolectaron en bajamar por mariscadores profesionales de la zona y las muestras de agua en la pleamar anterior.

En cada muestra, tanto en el agua como en los moluscos, se determinó la concentración de CF. Para el análisis de las almejas se utilizó el método de referencia especificado en la Directiva 79/923/CEE, optando en el caso del agua por el método de filtración por membrana propuesto en la Directiva 76/160/CEE del Consejo, de 8 de diciembre de 1975, para la determinación de los CF en las aguas de baño. Los análisis fueron realizados por el Laboratorio de Sanidad Animal de la Consejería de Ganadería, Agricultura y Pesca del Gobierno de Cantabria.

Para el tratamiento de los datos, tanto en el caso del agua como de los moluscos, se calculó en primer lugar la probabilidad de no superación, tomando como referencia el método de la frecuencia acumulada (WHO/UNEP, 1994; Bartram y Rees, 2000). Este método permite estimar la probabilidad de que una muestra no supere una determinada concentración de indicadores fecales, calculando en este caso la P50, P80, P90 y P95. Posteriormente, se efectuó un análisis de regresión entre las probabilidades de no superación obtenidas en el agua y en los moluscos. Los resultados obtenidos sirvieron de base para la estimación del factor de bioconcentración de CF en los moluscos.

En segundo lugar, se efectuó un análisis de la evolución de la contaminación bacteriológica en las zonas de producción de moluscos de la Bahía asociada a los alivios de tormenta del colector - interceptor en la situación de saneamiento futura, aplicando la metodología desarrollada para dicho entorno en el marco del convenio suscrito entre el Gobierno de Cantabria y la Universidad de Cantabria para el estudio del saneamiento de la bahía de Santander y el

establecimiento del programa de vigilancia y control ambiental (Revilla *et al.*, inédito). Dicha metodología consiste, básicamente, en la aplicación de modelos hidrológicos, hidráulicos, hidrodinámicos y de calidad (tasas de desaparición bacteriana), que permiten predecir el tiempo que en un año tipo se supera una determinada concentración de CF (tiempo de incumplimiento) en distintos puntos de control de la Bahía (figura 1). Estos datos permiten estimar la probabilidad de que se superen los criterios de calidad (probabilidad de rechazo), partiendo de la hipótesis de que se realiza un muestreo aleatorio correspondiente a 20 muestras tomadas a lo largo de un año (Nikolov *et al.*, 1994)

## RESULTADOS

Las concentraciones de coliformes fecales registradas en la zona de estudio oscilaron entre 0 y 344 UFC/100 ml en el agua, y entre 33 y 3 300 UFC/100 ml en los moluscos, obteniéndose unos valores medios de 67 UFC/100 ml y 1 396 UFC/100 ml, respectivamente. No obstante, en el caso del agua hay que indicar que se registraron muchos valores nulos (que podrían corresponder en realidad a falsos negativos), obteniéndose valores medios de 100 UFC/100 ml, si no se consideran dichos datos. De los datos obtenidos destacan los elevados coeficientes de variación que presentan las concentraciones de CF, tanto en el agua (80 %) como en las almejas (63 %).

De forma más detallada, en la tabla I se especifican los valores medios y las desviaciones estándar correspondientes a cada día y zona de estudio. De estos datos puede destacarse que, si únicamente consideramos los valores medios globales, por zonas o días de muestreo, las concentraciones de CF registradas en la carne y líquido intervalvar de las almejas son del orden de 10 a 20 veces superiores que las medidas en el agua, salvo excepciones que presentan diferencias extremas.

Tabla I. Concentraciones medias de coliformes fecales y desviaciones estándar registradas en las tres zonas de estudio y días de muestreo.

	Dársena sur de Raos		Ensenada de San Bartolomé		Pantalán de Calatrava		Total	
	Agua	Moluscos	Agua	Moluscos	Agua	Moluscos	Agua	Moluscos
1.º día	0,0 ± 0,0	1 784 ± 627	80 ± 111	980 ± 848	65 ± 66,3	208 ± 147	48 ± 78	991 ± 876
2.º día	1,6 ± 3,6	860 ± 1 150	0,4 ± 0,9	1 521 ± 900	0,0 ± 0,0	1 808 ± 285	1,0 ± 2,0	1 396 ± 895
3.º día	51,6 ± 57,8	2 452 ± 71	205 ± 97,6	579 ± 925	197 ± 67,9	2 370 ± 619	151 ± 102	1 800 ± 1 075
Total	17,7 ± 39,6	1 698 ± 973	95 ± 1 17,6	1 026 ± 917	87,4 ± 98,9	1 461 ± 1 019	67 ± 96	1 396 ± 989

Estos valores se encuentran dentro del rango permitido en el Real Decreto 345/1993, de 5 de marzo, para las zonas de producción calificadas como zonas tipo B (< 6 000 CF/100 ml), caso de las zonas objeto de estudio, pero superan los criterios para su posible consideración como zonas tipo A (< 300 UFC/100 ml).

En la figura 2 se muestran las curvas de probabilidad acumulada elaboradas con los datos de concentración de CF correspondientes al agua y a los moluscos, indicando asimismo las probabilidades de no superación calculadas a partir de dichas curvas (P50, P80, P90 y P95). Respecto a estos resultados, hay que destacar que las concentraciones de CF en los moluscos correspondientes a una determinada probabilidad de no superación son, en todos los casos, del orden de 10 veces las que se obtienen para el agua.

En concordancia con estos resultados, en el análisis de regresión se obtiene una correlación estadísticamente significativa ( $R = 0,99$ ) entre las probabilidades de no superación correspondientes al

agua y a los moluscos (figura 3). De acuerdo con la recta de regresión obtenida ( $P\ CF\ almejas = 367 + 9,46 \times P\ CF\ agua$ ), para una misma probabilidad de no superación ( $P_{xx}$ ), la concentración de CF en los moluscos es 9,45 veces la del agua, con un valor residual de 367.

En cuanto al análisis de la evolución de la contaminación bacteriológica derivada de los alivios de tormenta del colector - interceptor en la situación de saneamiento futura, las simulaciones efectuadas indican que los puntos más afectados serían los más próximos al canal de navegación, justo en el límite de la zona de producción de moluscos. Por el contrario, la mayor parte de las zonas de producción de moluscos presentan probabilidades de rechazo inferiores al 5 %, incluso considerando la concentración de 100 UFC/100 ml. Como síntesis de los resultados obtenidos, en la tabla II se indican, para diversos puntos de control localizadas en las zonas de producción de moluscos (figura 1), los tiempos de superación anuales para un rango de concentraciones de indicadores de contaminación fecal (100 – 1 000 UFC/100 ml) y las probabilidades de rechazo asociadas.

**DISCUSIÓN**

Los rangos de variación que presentan las concentraciones de coliformes fecales registradas en la bahía de Santander se corresponden con la variabilidad habitual que presentan estos indicadores, determinada, en gran parte, por los cambios continuos que se producen en las condiciones ambien-

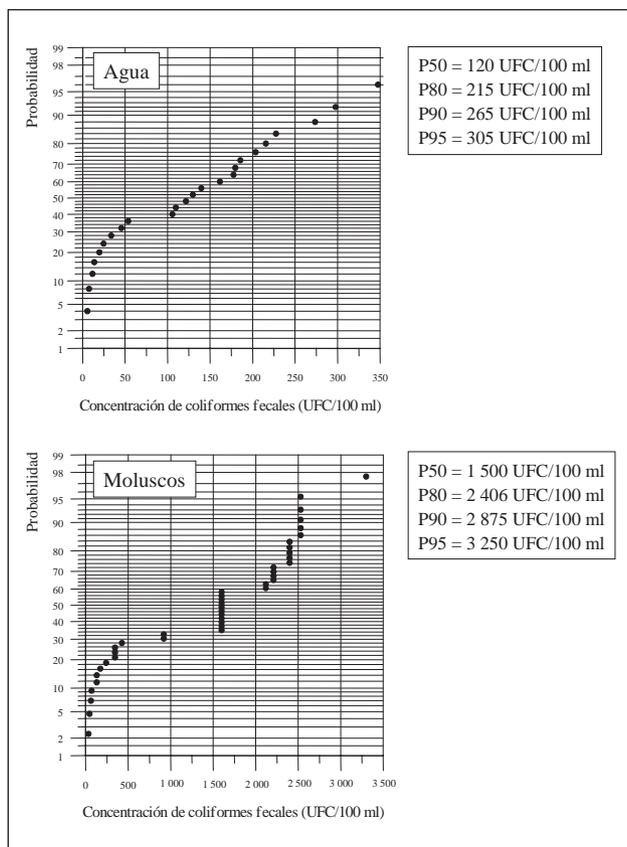


Figura 2. Curvas de probabilidad acumulada y probabilidades de no superación (P50, P80, P90 y P95) obtenidas para las concentraciones de coliformes fecales en el agua y en los moluscos.

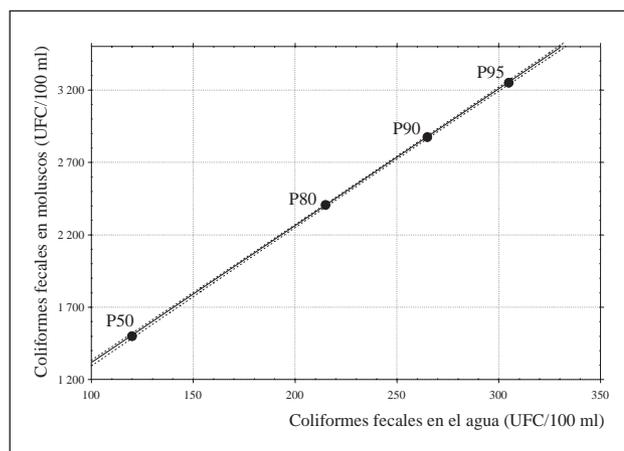


Figura 3. Resultados del análisis de correlación efectuado entre las probabilidades de no superación de las concentraciones de coliformes fecales correspondientes al agua y a los moluscos.

Tabla II. Tiempos de superación (T: horas/año) de las concentraciones de 100, 200, 300, 600 y 1 000 UFC/100 ml y probabilidades de rechazo (Pr, en porcentaje) asociadas a los mismos, en distintos puntos de control localizados en las zonas de producción de moluscos de la bahía de Santander (véase figura 1).

	100 UFC/100 ml		200 UFC/100 ml		300 UFC/100 ml		600 UFC/100 ml		1 000 UFC/100 ml	
	T	Pr	T	Pr	T	Pr	T	Pr	T	Pr
PC26	147	0,35	92	0,09	68	0,05	29	0,01	17	0,01
PC27	486	9,35	355	4,28	301	2,85	234	1,55	188	0,79
PC28	650	17,94	503	10,15	441	7,44	358	4,28	295	2,75
PC29	751	24,10	604	14,90	543	12,20	439	7,44	356	4,40
PC30	561	13,20	435	7,25	358	4,60	263	2,05	208	1,10
PC31	350	4,27	264	2,06	218	1,24	163	0,58	123	0,24
PC32	325	3,54	253	1,85	207	0,96	149	0,42	111	0,19
PC33	71	0,05	48	0,01	40	0,01	23	0,01	9	0,01
PC34	50	0,02	37	0,01	29	0,01	18	0,01	9	0,01

tales (mareas, irradiación, etc.) y las propias variaciones temporales de las cargas contaminantes que se introducen en el estuario. No obstante, en este caso concreto, la variabilidad registrada parece responder en mayor grado al sesgo del muestreo y a las imprecisiones y fuentes de error que introducen los procedimientos analíticos (Breitmayer y Gauthier, 1979), dado que se observan diferencias considerables entre réplicas correspondientes a una misma zona y día de estudio.

En lo que respecta a la mayor variabilidad que presentan las mediciones de CF en el agua, Plusquellec, Beicher y Le Gal (1983) también obtienen mayores coeficientes de variación en las concentraciones de coliformes fecales registradas en el agua (31,4%) que en las medidas en mejillones (20,4%), aunque, tal y como señalan dichos autores, esta mayor variabilidad podría deberse a las bajas concentraciones existentes. En todo caso, la variabilidad de la concentración de CF en los moluscos sigue siendo muy significativa, aspecto que constituye una de las principales limitaciones en el diseño de los programas de vigilancia de las zonas de producción de moluscos y determina que la frecuencia mínima trimestral que establece la Directiva 79/923/CEE se considere insuficiente para valorar con rigor la evolución de la contaminación fecal en dichas zonas.

Sin obviar esta variabilidad, lo que evidencian los resultados obtenidos es la capacidad de los moluscos de concentrar las bacterias presentes en el agua circundante y la posibilidad de establecer un criterio de calidad en el agua basado en la relación existente entre las concentraciones de CF en el agua y en los moluscos. Como primera aproximación, la comparación entre las concentraciones medias y

las correspondientes a una misma probabilidad de rechazo permiten estimar un factor de bioconcentración medio del orden de 10. Este valor es semejante al factor de 13,2 obtenido por Plusquellec, Beucher y Le Gal (1983) en mejillones y se encuentra dentro del rango, entre 3 y 50, registrado en estudios llevados a cabo en distintas zonas (Prieur *et al.*, 1990). No obstante, hay que indicar que los factores de concentración obtenidos en dichos estudios no son constantes, sino que dependen de factores como el tiempo que permanecen los organismos expuestos a la contaminación, la materia en suspensión o la época del año (Poggi, 1990; Guillaud, Le Saux y Pommeupuy, 1997).

Este hecho, unido a la variabilidad registrada y al limitado volumen de datos con los que se cuenta, determina que el planteamiento de un factor de bioconcentración para la bahía de Santander requiera la obtención de series de datos más amplias que permitan fijar los rangos de variación y ajustar los valores a diferentes condiciones ambientales (por ejemplo, época del año).

Aun teniendo estas limitaciones en cuenta, si consideramos los valores de 10 y 30, correspondientes al factor de bioconcentración estimado en este estudio y a la media de los máximos registrados en otras zonas (Guillaud, Le Saux y Pommeupuy, 1997; Mauvis y Goarnisson, 1999), respectivamente, para no superar la concentración de 6 000 UFC/100 ml, establecida como límite para las zonas de producción de moluscos del tipo B, tendríamos que mantener concentraciones en el agua entre 200 UFC/100 ml, considerando la situación más desfavorable, y 600 UFC/100 ml.

Partiendo de lo expuesto anteriormente, y tomando como referencia los porcentajes de incum-

plimiento que permite la Directiva 76/160/CE para los valores guía e imperativos de concentraciones de CF en el agua de las zonas de baño, se propone como criterio de calidad bacteriológica en el agua de las zonas de producción de moluscos de la bahía de Santander el siguiente: La concentración de coliformes fecales en el entorno acuático no deberá superar los 600 UFC/100 ml en el 95 % de las muestras, ni los 200 UFC/100 ml en el 80 % de las muestras, tomando un mínimo de 20 muestras a lo largo de un ciclo anual.

La consideración de este criterio de calidad permite valorar los resultados obtenidos en las simulaciones efectuadas para analizar la evolución de la contaminación bacteriológica en la situación de saneamiento futura, en lo que respecta a su posible afección sobre la calidad de los moluscos. Según dichos resultados, puede predecirse que en la situación de saneamiento futura se cumplirán los criterios de calidad establecidos en la Directiva 79/923/CEE en las zonas de producción de moluscos de la Bahía.

Asimismo, considerando la mayor laboriosidad que supone el muestreo y las técnicas analíticas de los moluscos, la utilización de la concentración de CF en agua, como criterio de calidad bacteriológica complementario para el control de las zonas de producción de moluscos, facilitaría el establecimiento de protocolos de muestreo más intensivos que los que se desarrollan actualmente. Por ello, se propone complementar el programa de vigilancia que desarrolla la Consejería de Agricultura, Ganadería y Pesca del Gobierno de Cantabria en la Bahía, con la toma de muestras de agua quincenalmente. La integración de este protocolo serviría, por una parte, para poder precisar los factores de bioconcentración y, por otra, para poder tener un registro más preciso de la evolución temporal de la contaminación bacteriológica en las zonas de producción de moluscos. Además, estos registros permitirían alertar sobre posibles episodios contaminantes, difícilmente detectables con la frecuencia de muestreo que se sigue actualmente, incrementando de esta forma las garantías en cuanto a la calidad sanitaria y la salubridad de los moluscos recolectados en la bahía de Santander.

## CONCLUSIONES

Se ha encontrado una relación estadísticamente significativa entre las probabilidades de ocurrencia

de una determinada concentración de CF en el agua y en los moluscos.

El factor de bioconcentración estimado en la bahía de Santander confirma los valores obtenidos en otros estudios y permite establecer un rango de variación entre 10 y 30.

De acuerdo con estos resultados, se pueden proponer las concentraciones de 600 UFC/100 ml y 200 UFC/100 ml en el agua como valores límite a contemplar en los estudios de calidad de las aguas en las zonas de producción de los moluscos.

Los valores de indicadores de contaminación fecal registrados en este estudio permiten indicar que con concentraciones de CF en el agua en el rango de las obtenidas no es previsible que se superen los criterios de calidad bacteriológica de moluscos establecidos legalmente para las zonas de producción tipo B.

## AGRADECIMIENTOS

Los resultados del presente trabajo tienen su origen en dos proyectos de investigación realizados en colaboración con la Consejería de Ganadería, Agricultura y Pesca y la Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio del Gobierno de Cantabria.

## BIBLIOGRAFÍA

- Bartram, J. y G. Rees. 2000. *Monitoring Bathing Waters. A practical guide to the design and implementation of assessments and monitoring programmes*. Routledge. Andover, Hunts, Reino Unido: 337 pp.
- Beucher, M., S. Corre, J. J. Cleret, E. Jacq y A. Plusquellec. 1989. *Étude de l'accumulation, de la rétention et du relargage de bactéries d'intérêt sanitaire par Crassostrea gigas*. Université de Bretagne Occidentale - Centre National de la Recherche Scientifique (UBO-CNRS). Contrat Ifremer n.º 87.2.43.0420. Dero/El: 61 pp.
- Bonde, G. J. 1977. Bacterial indication of water pollution. En: *Advances in Aquatic Microbiology*. M. R. Droop y H.W. Jannasch (eds.): 273-364. Academic Press. Londres.
- Breittmayer, J. P. y J. M. Gauthier. 1979. Dénombrement des bactéries en milieu marin. Facteurs de variation et d'incertitude. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)* 130: 245-256.
- Cabelli, V. J. y W. P. Hefferman. 1970. Accumulation of *E. coli* by the mother quahaug. *Appl. Microbiol.* 19: 239-244.
- Guillaud, J. F., J. C. Le Saux y M. Pommepuy. 1997. Compatibilité entre élevage conchylicole et rejets urbains dans l'estuaire de Morlaix (Finistère). En: *Les estuaires français. Evolution naturelle et artificielle*. C. Auger y J. L. Verrel (eds.): 130-140 Ifremer. Plouzané, Francia.

- Mauvis, J. L. y R. Goarnisson (eds.). 1999. *L'état de l'environnement sur la façade atlantique*. Ifremer. Plouzané, Francia: 140 pp.
- Nikolov, K., J. A. Revilla, C. Álvarez y A. Luceño. 1994. A desig methodology for combined sewer system elements with overflows in coastal zones. *Journal of Coastal Research* 10 (3): 531-538.
- Plusquellec, A., M. Beucher e Y Le Gal. 1983. Enumeration of the bacterial contamination of bivalves in monitoring the marine bacterial pollution. *Marine Pollution Bulletin* 14 (7): 260-263.
- Poggi, R. 1990. Impacts Sanitaires des contaminations microbiologiques. En: *La mer et les rejets urbains*. Actes du colloque de l'île de Bendor. (13-15 de junio, 1990). J. F. Guillaud y L. A. Romaña (eds.): 115-131. Ifremer. Plouzané, Francia.
- Prieur, D., G. Mével, J. L. Nicolas, A. Plusquellec y M. Vigneulle. 1990. Interactions between bivalve molluscs and bacteria in the marine environment. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.* 28: 277-352.
- WHO/UNEP. 1994. *Guidelines for health-related monitoring of coastal recreational and shellfish areas. Part IV. Statistical Methods. Document EUR/ICP/CEH 041(5)*. WHO/UNEP (World Health Organization / United Nations Environment Programme). Regional Office for Europe. Copenhagen: 55 pp.