

## Depuración microbiológica artesanal de la piangua, *Anadara tuberculosa* (Mollusca: Arcidae)

Eric Wong<sup>1</sup>, Florencia Antillón<sup>1</sup>, Eduardo Glenn<sup>2</sup> y María Isabel González<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Escuela de Tecnología de Alimentos, Universidad de Costa Rica, 2060 Costa Rica.

<sup>2</sup> Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, 2060 Costa Rica.

<sup>3</sup> Escuela de Economía Agrícola, Universidad de Costa Rica, 2060 Costa Rica.

Recibido 4-IV-1996. Revisado 7-XI-1996. Aceptado 10-III-1997.

**Abstract:** In Costa Rica the mollusk *Anadara tuberculosa* represents a risk for human health due to the contamination of the growing waters and the fact that it is consumed raw. The families depending on the income obtained through commercialization of these animals have a low education and economic status. Therefore, it is of great importance to develop and evaluate simple methods of depuration that could be easily used by these families to make these mollusks safe for consumption. Bottles containing 1 l of saline solution (25g/l) were prepared in duplicates to test the bactericidal effect of acetic acid. The solution in each bottle was adjusted to pH 4.5, 5.0 or 5.5 or held at pH of 7.0 or 8.0 for the controls. The solution in each bottle was then inoculated with approximately  $1 \times 10^4$  cfu/ml of coliforms. Counts of coliforms were determined for each bottle 0, 1, 2, 4 and 8 hours after inoculation. For the depuration studies, specimens with diameters ranging from 4.0 to 4.5 cm were collected from a harvester at the estuary of Puntarenas, Gulf of Nicoya. Fifty specimens each were depurated in separate tanks containing 25 l of oxygenated saline solution adjusted with acetic acid to an initial pH of 4.5 (treatment) or non adjusted pH of 8.0 (control). Counts of Enterobacteriaceae were determined, in duplicates, every 12 hr for 48 hr. An additional fifty animals were depurated using the defined method and tested to determine if they met international standards of microbiological quality for aerobic plate count, Enterobacteriaceae count, *Escherichia coli* count and presence of *Salmonella*. A sensory evaluation using a triangle test was performed to compare a typical dish prepared with depurated or non-depurated animals. A significant coliform reduction was determined in a saline solution (25 g/l) at a pH range of 4.5 to 5.5. This reduction, during 8 hr, was higher in the acid treatments compared to the controls. During depuration, the elimination of Enterobacteriaceae bacteria was faster when acetic acid was used (initial pH=4.5) than when it was not. This elimination was more important the first 24 hr, time defined as adequate for the application of the method. The method has the advantage of transforming the bivalve in a product that is safe for human consumption, since it guarantees that the international standards of microbiological quality, for raw and depurated mullusks, are reached. On the other hand, the sensory qualities of a typical dish prepared with depurated animals are not affected by the method, which can be easily implemented and applied by the people that work in the extraction of this mollusk..

**Key words:** *Anadara*, depuration, acetic acid, coliforms, Enterobacteriaceae.

La piangua (*Anadara tuberculosa*) es uno de los bivalvos más consumido en Costa Rica y constituye una especie de importancia comercial que ofrece excelentes posibilidades para el desarrollo pesquero y la maricultura (Cruz y Palacios 1983). Este marisco se consume principalmente como "ceviche", un aperitivo que se prepara con los jugos y la carne del bivalvo crudo, desconchado, con todas sus vísceras, en-

tero o picado y condimentado con cebolla, culantro y jugo de limón, y es reconocido como un alimento sabroso, digerible y nutritivo (Fernández y Ryan 1983).

En Costa Rica, la extracción de las pianguas se realiza en forma artesanal, sin que exista empresa alguna que las procese o comercialice en gran escala. Esta actividad la llevan a cabo familias con escasos ingresos económicos y nivel

de educación bajo, que viven cerca de los esteros en las costas. A pesar de esto, la cosecha de pianguas ha llegado a representar hasta un 50% del total de kilogramos de carne de moluscos cosechados, incluyendo entre otros pulpo, calamar y cambute. La extracción anual es de más de 6 millones de pianguas (Chacón 1994 com. pers.), lo que confirma la importancia de este recurso como fuente de alimento local y nacional y como una forma de subsistencia para las familias que se dedican a esta actividad.

Desafortunadamente, los bivalvos son reconocidos como acarreadores potenciales de microorganismos patógenos (virus y bacterias), como consecuencia de su mecanismo de alimentación por filtración, por medio del cual son capaces de concentrar aquellos microorganismos presentes en su hábitat natural (Madden *et al.* 1986). Por lo tanto, al igual que para otros bivalvos, hay una relación estrecha entre su calidad microbiológica y la calidad de las aguas en que viven (Fernández *et al.* 1977).

Una buena parte de las pianguas que se consumen en Costa Rica son cosechadas en zonas estuarinas del Golfo de Nicoya que se encuentran altamente contaminadas con materia fecal, como consecuencia de la descarga parcial de las aguas negras en los esteros. Esta contaminación ha causado que las pianguas, en términos generales, sean consideradas como un alimento no apto para el consumo humano (Fernández y Brunker 1977). En un estudio realizado por Fernández y Ryan (1983), se determinó que solamente un 7% de las pianguas rerecolectadas en algunas zonas del Golfo de Nicoya eran aptas para el consumo humano, y que el resto representaba un peligro inminente de intoxicación o infección alimentaria.

Dado que las pianguas se encuentran altamente contaminadas y se consumen normalmente crudas, éstas constituyen una fuente potencial de enfermedad para la población, y por lo tanto, resulta muy importante estudiar alternativas que permitan mejorar la calidad microbiológica de estos mariscos. Una de ellas es la depuración microbiológica, que consiste en un método que se utiliza ampliamente en países que cultivan moluscos en gran escala, con el fin de mejorar su calidad sanitaria si han sido cosechados de zonas contaminadas (Cantelmo y Carter 1992),

En los métodos de depuración existentes, los bivalvos son colocados en tanques limpios con circulación continua de agua tratada, que al ser

filtrada por los organismos permite la expulsión de la contaminación por arrastre. Este proceso requiere de equipo especializado de alto costo, pues para tratar el agua y lograr eliminar la contaminación en ella, se utilizan filtros de ozono, filtros de cloro, rayos ultravioleta u otros agentes, además de las instalaciones necesarias para lograr un sistema continuo (Blagoslawski *et al.* 1983). Como se deduce, estas condiciones no son compatibles con la forma artesanal en que se realiza la cosecha de pianguas en el país, ni con las condiciones de las familias que se encargan de realizar su comercialización.

Por lo anterior, en esta investigación se planteó el objetivo general de establecer un método de depuración que mejore la calidad microbiológica de las pianguas, de manera que cumpla con la norma internacional de calidad microbiológica para estos bivalvos, además de que no afecte sus cualidades sensoriales. Se buscó definir un método estacionario, asequible a la población que actualmente realiza la explotación de este molusco. En el método estacionario, el agua que se utiliza en el tanque contiene un agente bactericida que elimine los microorganismos expulsados durante el proceso de filtración de manera que no haya recontaminación, al no existir un proceso de arrastre.

En este caso, y con base en los resultados de Wong *et al.* (1996), se decidió evaluar la utilización de ácido acético como agente bactericida para el sistema estacionario. Estos autores encontraron, luego de estudiar varios agentes ácidos, que las pianguas logran neutralizar en cierto grado el efecto ácido de los agentes, sin embargo, esta neutralización fue más lenta en el caso del ácido acético, el cual además no afectó de ninguna forma el metabolismo de la piangua, la cual mostró una tasa de filtración normal en su presencia. El ácido acético, por otra parte, no es tóxico para el ser humano, su efecto bactericida por disminución de pH es muy efectivo, y aumenta en presencia de sal, por lo que es ampliamente utilizado en productos marinos (Lueck 1985).

## MATERIALES Y METODOS

Las pianguas utilizadas en este estudio fueron recolectadas en el estero de Puntarenas, Chacarita, Golfo de Nicoya, Costa Rica. Se utilizaron pianguas con tallas comprendidas entre

4.0 y 4.5 cm de diámetro, las cuales fueron lavadas en el sitio de compra para eliminar toda la suciedad posible, y transportadas, sin agua, al laboratorio. Los animales fueron colocadas en los diferentes tratamientos tan pronto como fue posible, con el fin de minimizar la afección de su metabolismo por haber sido extraídas de su hábitat natural. La apertura de las conchas se realizó siguiendo las técnicas asépticas y la masa de muestra utilizada estuvo compuesta por partes iguales de líquido paleal.

El ácido acético utilizado fue vinagre sintético comercial (Columbia) con una concentración de 4% V/V. La preparación de la solución salina y el establecimiento de las condiciones de oxigenación en los diferentes ensayos "in vitro", en recipientes de vidrio, se basó en el método descrito por Wong *et al.* (1996).

El primer experimento consistió en la confirmación del efecto bactericida del ácido acético. Para esto se aisló, de las pianguas recolectadas, una cepa de coliformes según el método citado en el Bacteriological Analytical Manual (Anónimo 1992), por ser los microorganismos más resistentes de la familia *Enterobacteriaceae*, utilizada en este caso como indicador de depuración (Pascual 1989).

En los recipientes necesarios, con capacidad de 1 litro, se colocó un litro de solución salina y se mantuvieron a temperatura ambiente. Se prepararon por duplicado los diferentes tratamientos ajustando la solución salina con ácido acético a niveles de pH de 4.5, 5.0 y 5.5. Se mantuvieron 2 ensayos control, sin ácido acético, a niveles de pH de 7.0 y 8.0 también por duplicado. Mediante comparación con el estándar de McFarland N°1 (Mac Faddin 1981), de aproximadamente 300 millones de células por mililitro, se preparó un inóculo a partir de la cepa fresca de coliformes y se agregó a los recipientes de manera que se obtuviera una concentración final aproximada de  $10^4$ /ml.

A partir de la inoculación, a las 0, 1, 2, 4 y 8 horas, se determinó la carga total de bacterias coliformes en la solución de los recipientes por medio de la técnica de Recuento de Coliformes, utilizando placas de agar bilis rojo violeta, descrita en el Bacteriological Analytical Manual (Anónimo 1992), y se midió el pH.

Este diseño correspondió a un irrestricto al azar en un arreglo factorial 5 X 5 (pH X tiempo) que produjo 25 tratamientos. Se realizó un análisis de variancia con el fin de determinar la

significancia de los efectos simples, tiempo y pH, y su interacción, utilizando como variable dependiente el recuento de coliformes. Además, se realizó un análisis de regresión con el fin de estudiar la tendencia del recuento de coliformes en el tiempo. Al igual que en todos los experimentos de este estudio, el análisis se llevó a cabo utilizando el paquete estadístico SAS.

En el siguiente experimento se determinó el tiempo de depuración de las pianguas utilizando ácido acético. En uno de los recipientes con capacidad para 30 litros se colocaron 25 litros de solución salina, se incluyó oxigenación a saturación y se mantuvo a temperatura ambiente. La solución salina se ajustó a un pH de 4.5 definido con base en el experimento anterior, y los resultados de Wong *et al.* (1996). En otro recipiente igual se mantuvo un ensayo control sin ácido acético a un pH de 8.0 (pH propio de la solución salina sin modificar).

En cada recipiente se colocaron 50 pianguas. A partir de ese momento, cada 12 horas y por un lapso de 48 horas, se determinó, por duplicado, la carga total de enterobacterias en la carne y líquido de las pianguas, de acuerdo con el método para coliformes descrito en el Bacteriological Analytical Manual (Anónimo 1992), con la modificación de que se agregó 10 gramos de glucosa a cada litro de agar bilis rojo violeta. Los 25 gramos de muestra utilizados correspondieron aproximadamente a 5 individuos.

El diseño experimental consistió en un irrestricto al azar en un arreglo factorial 2 X 5 (agente X tiempo) que produjo 10 tratamientos. Se realizó un análisis de variancia con el fin de determinar la significancia de los efectos simples, tiempo y agente, y su interacción, utilizando como variable dependiente el recuento de enterobacterias. También se analizó la significancia de la tendencia del recuento de enterobacterias en el tiempo, durante el proceso de depuración, utilizando un análisis de regresión.

Seguidamente se procedió a determinar si el producto final depurado cumplía con las normas internacionales de calidad microbiológica para este tipo de productos. Para esto se depuraron 10 pianguas utilizando el método definido en el experimento anterior, y por duplicado, y para 25 gramos de muestra, se realizaron los siguientes análisis: recuento total aerobio siguiendo el método descrito por el Bacteriological Analytical Manual (Anónimo 1992), recuento de entero-

bacterias como se describió en el experimento anterior, recuento de *Escherichia coli* utilizando la técnica de PETRIFILM de la casa comercial 3M, Minnessota, E.U.A. y presencia de *Salmonella* utilizando la técnica de ELISA de la casa comercial TRANSIA-DIFFCHAMB, Lyon, Francia. Los promédios obtenidos para cada uno de los análisis se compararon con los niveles permitidos por las normas respectivas.

Por último se realizó un análisis sensorial para determinar si existía diferencia significativa en los atributos sensoriales de las pianguas depuradas con respecto a las pianguas sin depurar. Para esto se prepararon 2 kilogramos de ceviche compuesto por el jugo y la carne de pianguas sin depurar, jugo de limón, cebolla y culantro picados. Utilizando la misma proporción de ingredientes, y bajo las mismas condiciones, se procedió a preparar otro ceviche utilizando pianguas depuradas con el método que fue definido previamente.

Se realizó una prueba triangular de diferencia, por duplicado, con 26 jueces panelistas no entrenados, consumidores habituales de pianguas, y de acuerdo con el método descrito por Pangborn y Pedrero (1989), en el que se le pre-

senta al panelista un trío de muestras en el que dos de ellas son iguales y la otra es diferente, y el panelista debe indicar cuál es la diferente.

Tomando las repeticiones como observaciones individuales (para un total de 52 observaciones), se procedió a tabular el número de aciertos y desaciertos. El número de aciertos obtenido fue comparado con el número de aciertos tabulado (Pangborn y Pedrero 1989) necesario para obtener significancia en la diferencia, con 52 observaciones y a un nivel de significancia del 5%

RESULTADOS Y DISCUSION

Al evaluar el poder bactericida del ácido acético, se determinó que la carga de coliformes fue distinta en los diferentes niveles de pH ( $p=0.0001$ ) y en los diferentes tiempos de medición ( $p=0.0001$ ). La interacción significativa entre ambos efectos simples ( $p=0.0001$ ) evidenció que la tendencia de reducción de coliformes en el tiempo fue diferente para cada nivel de pH ensayado, lo cual se estudió por medio de un análisis de regresión (Cuadro 1 y Fig. 1).

CUADRO 1

Recuento de coliformes (UFC/ml) en el tiempo, según nivel de pH.

Tiempo (horas)	pH = 4.5	pH = 5.0	pH = 5.5	Control pH = 7.0	Control pH = 8.0
0	125000	120000	120000	125000	130000
1	39000	90000	55000	112000	106000
2	5250	8650	19000	105000	98000
4	50	90	150	100000	85000
8	1	1	1	97000	36000

Nota: Para efectos del análisis estadístico y de la graficación de los datos, se anotaron con valor de 1 UFC/ml los datos que corresponden a resultados negativos en la dilución  $10^{-1}$ , y que equivalen a menos de 10 UFC/ml.

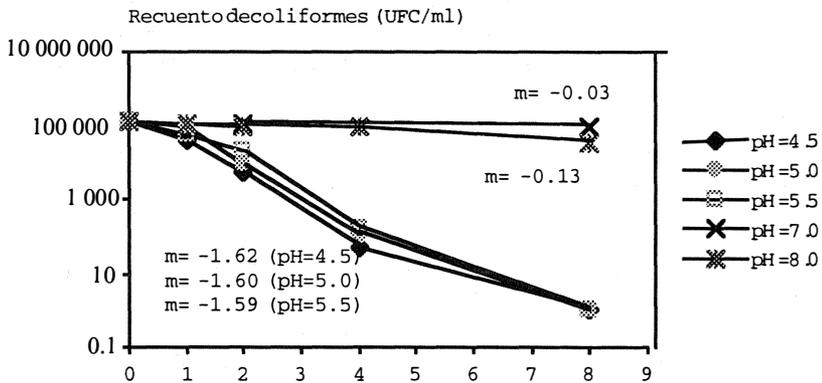


Fig. 1. Recuento de coliformes en el tiempo, según nivel de pH.

Las tendencias de reducción de coliformes muestran que la interacción entre el tiempo y el nivel de pH se debió principalmente a la diferencia entre los tratamientos ácidos con respecto a los controles. Aunque la muerte logarítmica de los coliformes es más rápida a un pH de 4.5 que a 5.0 y a 5.5, la tendencia es similar, lo cual se evidencia en las pendientes significativas ( $p=0.0001$ ) -1.59, -1.60 y -1.62 respectivamente.

Analizando los controles a pH de 7.0 y 8.0, se nota que a un pH de 7.0 la muerte fue menor ( $m = -0.03$ ) que a un pH de 8.0 ( $m = -0.13$ ). Puede observarse con claridad que en cualquiera de los tratamientos ácidos se logró reducir la carga de coliformes en 5 unidades logarítmicas, mientras que en el control a pH de 8.0 se redujo en una unidad logarítmica y a pH de 7.0 prácticamente se mantuvo en la misma unidad. Todos estos resultados son consistentes con lo que plantea Lueck (1985), en relación con el hecho de que existe un ámbito óptimo de valores de pH para el crecimiento de cada grupo o género microbiano (que para los coliformes está alrededor de 7.0), y que conforme el pH se aleja de ese ámbito, ocurre la muerte del microorganismo.

En síntesis, esta prueba resultó útil para com-

probar que en un ámbito de valores de pH entre 4.5 y 5.5, se logra una reducción significativa e importante de coliformes en la solución salina empleada, y por lo tanto, se consideró viable la utilización del ácido acético para definir un sistema estacionario de depuración para bivalvos, basado en el monitoreo de la familia de las enterobacterias (de las cuales los coliformes son los más resistentes). La familia *Enterobacteriaceae* incluye, además de los coliformes, a algunas bacterias patógenas importantes, y es por ello que se sugiere su utilización como indicador de depuración (Pascual 1989).

En el ensayo para definir el tiempo de depuración de las pianguas, al utilizar ácido acético en un sistema estacionario, se encontró nuevamente un efecto significativo del medio de depuración ( $p=0.0001$ ) y el tiempo ( $p=0.0001$ ). De igual forma resultó significativa la interacción entre ambos efectos simples ( $p=0.0005$ ), implicando que el recuento de enterobacterias encontrado a lo largo del tiempo fue diferente para la depuración con ácido acético con respecto a la depuración sin ácido (control). La tendencia del recuento de enterobacterias para ambos tratamientos, a lo largo del tiempo, se estudió por medio de un análisis de regresión (Cuadro 2 y Fig. 2).

#### CUADRO 2

Recuento de enterobacterias (UFC/g) para la carne y sangre de pianguas en depuración, con y sin ácido acético, y valor de pH en la solución salina, según tiempo.

Tiempo (horas)	Depuración con ácido acético	Valor de pH observado	Depuración sin ácido acético	Valor de pH observado
0	80500	4.5	81000	8.0
12	2500	5.0	30000	8.2
24	700	5.7	7500	8.4
36	435	6.4	8500	8.3
48	110	7.2	5250	8.4

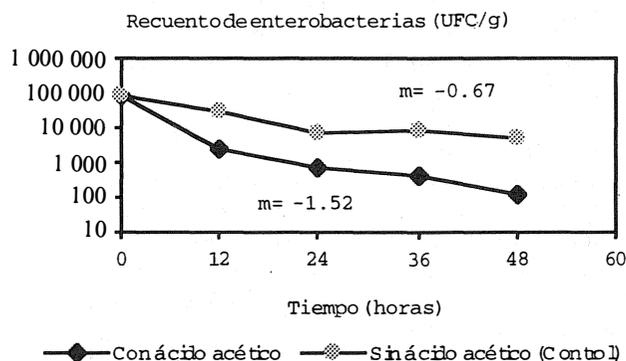


Fig. 2. Recuento de enterobacterias (UFC/g) para la carne y sangre de pianguas en depuración, con y sin ácido acético, según tiempo.

La depuración con ácido acético fue significativamente ( $p=0.0001$ ) más rápida ( $m= -1.52$ ) que la depuración sin el ácido ( $m= -0.67$ ). La remoción en el tratamiento sin vinagre pudo deberse a la actividad normal de filtración de las pianguas, sin embargo, esta remoción fue mucho más rápida cuando se utilizó el ácido, evidenciando su efecto bactericida positivo en este sistema de depuración. Así mismo pudo observarse que, tanto para la depuración con ácido como para el control, la reducción fue mucho más importante en las primeras 24 horas. En el caso de la depuración con ácido la reducción de enterobacterias fue de 2 unidades logarítmicas en las primeras 24 horas y de una unidad en las siguientes 24 horas, mientras que para el control, la reducción fue de una unidad logarítmica y ninguna unidad respectivamente.

En el caso del control el pH se mantuvo prácticamente constante, lo que confirma el hecho de que la remoción en este caso se debe a la actividad de filtración de los animales. En el caso de la depuración con ácido acético se observó que, luego de las primeras 24 horas de depuración, ya el pH presentaba valores superiores a 5.5, que como ya se discutió, no garantizan la eliminación de las enterobacterias.

Por lo anterior, se definió un tiempo de depuración de 24 horas para el método evaluado, en el que se utilizaron las condiciones ya mencionadas, y con el cual se obtuvo una carga final de 700 enterobacterias por gramo en la carne y sangre de las pianguas. La reducción en la carga de enterobacterias (99%), lograda luego de aplicar por 24 horas el método estudiado, concuerda con Blogoslawski (1991), quien afirma que los métodos de depuración existentes garantizan una reducción de hasta el 90% de la contaminación bacteriana en un período de 24 a 72 horas. En ese sentido el método estacionario evaluado no difiere de los métodos automatizados y de alto costo que se utilizan en la actualidad.

Ya que no se logró eliminar por completo la presencia de enterobacterias en los animales, se procedió a evaluar la calidad microbiológica del producto final depurado, con base en las normas internacionales para estos productos (Pascual 1989 y Anónimo 1992), con el fin de establecer si el método definido garantizaba un producto apto para el consumo humano. El valor final de enterobacterias (620 por gramo), encontrado en las pianguas que fueron depuradas en esta segunda corrida con el método defi-

nido, fue muy similar al encontrado en el ensayo anterior (700 por gramo) y cumple con la norma internacional que permite como máximo la presencia de 1000 por gramo (Pascual 1989). Ya que las enterobacterias constituyen un buen índice de depuración (Pascual 1989), es muy importante que el método definido garantice el cumplimiento de esta norma.

El resto de los parámetros incluidos en la norma se cumplen de acuerdo con los análisis realizados. El valor encontrado para *E. coli* (menos de 10 por gramo), implica ausencia de contaminación fecal, y al no haber encontrado *Salmonella*, puede afirmarse que este patógeno común en bivalvos también está ausente del producto final. Ambos resultados son consistentes con lo encontrado para las enterobacterias, ya que estos dos microorganismos pertenecen a esa familia. Por último, el recuento total aerobio, índice de sanidad general del producto (Pascual 1992), también presentó un valor (47000 por gramo) inferior al permitido por la norma (100000 por gramo), indicando, junto con el resto de los análisis, que el producto final depurado y crudo, es apto para el consumo humano desde el punto de vista de su calidad microbiológica.

El análisis sensorial, en el que se comparó un ceviche elaborado con pianguas depuradas, contra uno elaborado con pianguas sin depurar, permitió determinar que los panelistas no percibieron diferencia en las cualidades de sabor, color, textura, aroma y apariencia general. Esto quiere decir que el ceviche preparado con pianguas depuradas tuvo las mismas cualidades gustativas con respecto al ceviche reconocido como patrón (preparado con pianguas sin depurar), y que el método definido para depurar dichos bivalvos no afecta sus cualidades sensoriales. De 52 observaciones se requerían 25 aciertos para que la diferencia fuera significativa al 95% de confianza (Pangborn y Pedrero 1989), y únicamente 20 de las observaciones correspondieron a aciertos por parte de los panelistas.

El método para la depuración de pianguas, establecido y evaluado en esta investigación, se resume de la siguiente manera: en una pileta limpia y de capacidad apropiada se coloca por lo menos medio litro de solución salina ácida por cada piangua que se desea depurar, se incluye oxigenación a saturación por medio de un compresor y se agregan las pianguas a la pileta. Después de 24 horas las pianguas depuradas se

retiran de la piletta y pueden ser comercializadas empleando las técnicas higiénicas necesarias. La solución salina se prepara con agua clorada que se ha mantenido en reposo por 24 horas, a la cual se le agrega sal cruda sin tratar, obtenida de la deshidratación solar de agua de mar, y en una proporción de 26 gramos de sal por litro de agua. El pH de la solución se ajusta a un valor de 4.5 agregando 6 mililitros de ácido acético (4% V/V) por cada litro de solución.

Este método no solo garantiza una reducción importante de la contaminación natural en las pianguas, sino que da como resultado un producto que cumple con las normas internacionales para este tipo de productos y que es apto para el consumo humano desde el punto de vista microbiológico y sensorial. Además, el método se ajusta a la realidad artesanal y nacional de explotación de las pianguas en el país, pues se considera que no representa ningún peligro para las personas que lo implementen y es de bajo costo.

#### AGRADECIMIENTO

Agradecemos a María Luisa Fournier (ECOTEC) por su asesoría, especialmente en el establecimiento de las condiciones de cultivo "in vitro" para las pianguas. A Laura Villalobos (Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica), por su aporte significativo.

#### RESUMEN

El molusco *Anadara tuberculosa* representa en Costa Rica un riesgo para la salud humana a causa de la contaminación de las aguas en las que crece y por el hecho de que se consume crudo. Las familias cuyo ingreso depende de la captura y comercialización de estos animales tienen niveles educativo y económico bajos. Por consiguiente, es de gran importancia producir y evaluar métodos sencillos de depuración que puedan ser usados por estas familias con facilidad. Se prepararon, por duplicado, botellas con 1 l de solución salina (25g/l) para probar el efecto bactericida del ácido acético. La solución de cada botella se ajustó a pH de 4.5, 5.0 ó 5.5, o se mantuvo a pH de 7.0 ó 8.0 para controles. Se inoculó la solución de cada botella con aproximadamente  $1 \times 10^4$  cfu/ml de coliformes. Se hicieron conteos de coliformes en cada botella 0, 1, 2, 4 y 8 hr después de la inoculación. Para la depuración se recolectaron especímenes de 4.5 a 5.5 cm de diámetro, en el estero de Puntarenas, Golfo de

Nicoya. Se depuraron 50 especímenes en tanques separados que contenían 25 l de solución salina oxigenada ajustada con ácido acético a un pH inicial de 4.5 (tratamiento) o a un pH no ajustado de 8.0 (control). Se efectuaron conteos de Enterobacteriaceae, por duplicado, cada 12 hr por 48 hr. 50 animales adicionales se depuraron usando el método experimental probado, para determinar si cumplían con los estándares de calidad microbiológica para conteos aeróbicos, de Enterobacteriaceae, de *Escherichia coli* y para presencia de *Salmonella*. Se hizo una evaluación sensorial mediante la prueba de triángulo para comparar un plato típico preparado con animales depurados y con animales sin depurar. Se comprobó que en un ámbito de pH de 4.5 a 5.5, ajustado con ácido acético en una solución salina (25 g/l), ocurre una reducción significativa de coliformes a lo largo de 8 horas de estudio, en comparación con la observada en los controles a pH de 7.0 y 8.0. Este poder bactericida del ácido acético permitió establecer un método estacionario y artesanal para la depuración de pianguas (*Anadara tuberculosa*). Durante la depuración, la eliminación de las bacterias de la familia Enterobacteriaceae fue más rápida cuando se utilizó ácido acético a un pH inicial de 4.5 que cuando no se utilizó el ácido. Dicha eliminación fue más importante en las primeras 24 horas, tiempo que se definió como el adecuado para aplicar el procedimiento establecido. El método tiene la ventaja de que transforma al bivalvo en un producto apto para el consumo humano, pues logra que se cumplan las normas internacionales de calidad microbiológica para moluscos crudos y depurados. Por otra parte, las cualidades sensoriales del alimento no se ven afectadas por el método, que además es de fácil aplicación para quienes se encargan de la extracción del molusco.

#### REFERENCIAS

- Anónimo. 1992. Bacteriological analytical manual. 7 ed. Association of Official Analytical Chemistry. U.S. Food and Drug Administration (FDA). Arlington, Virginia.
- Blagoslawski, W. & M. Stewart, 1983. Depuration and public health. J. World Mariculture Soc. 41: 535-545.
- Blagoslawski, W. 1991. Enhancing shellfish depuration. Molluscan Shellfish Depuration. pp 145-148
- Cantelmo, F. & Carter, T. 1992. A physiological indicator of hard clam commercial depuration. MTS 23: 9-13.
- Cruz, R. & J. Palacios, 1983. Biometría del molusco *Anadara tuberculosa* en Punta Morales, Puntarenas, Costa Rica. Rev. Biol. Trop. 31: 175-179.
- Fernández, B. & T. Bruncker, 1977. Estudio bacteriológico de bivalvos del Golfo de Nicoya, Costa Rica (I Parte). Rev. Biol. Trop. 25: 101-107.

- Fernández, B. & K. Ryan, 1983. Estudio bacteriológico de bivalvos del Golfo de Nicoya, Costa Rica (II Parte). *Rev. Biol. Trop.* 31: 311-316.
- Lueck, E. 1985. Antimicrobial food additives. Springer, Berlín.
- MacFaddin, J. 1981. Biochemical tests for identification of medical bacteria. Williams & Wilkins, Nueva York.
- Madden, R., *et al.* 1986. *Clostridium perfringens* as an indicator of hygienic quality of depurated shellfish. *J. Food Prot.* 49: 33-36.
- Madrigal, E. 1985. Tasa de filtración del ostión de manglar, (*Crassostrea rhizophorae*, Guilding 1828), a diferentes salinidades y temperaturas. *Rev. Biol. Trop.* 33: 77-79.
- National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods (NACMCF) 1992. Microbiological criteria for raw molluscan shellfish. *J. Food Prot.* 55: 463-480.
- Pangborn, R. & D. Pedrero, 1989. Evaluación sensorial de los alimentos: Métodos analíticos. Alhambra Mexicana, México D.F.
- Pascual, M. 1989. Microbiología alimentaria: Detección de bacterias con significado higiénico-sanitario. AGISA, Madrid.
- Pascual, M. 1992. Microbiología alimentaria. Díaz Santos, Madrid.
- Wong, E., J. Antillón, E. Gleen & M.I. González. 1997. Efecto de varios agentes, a diferentes niveles de pH, sobre la tasa de filtración de la piangua (*Anadara tuberculosa*). *Rev. Biol. Trop.* 45: 1453/1457.