

USO DE *Clostridium perfringens* COMO INDICADOR DE CONTAMINACIÓN FECAL EN ZONAS DE CULTIVO DE MOLUSCOS BIVALVOS EN EL ESTADO SUCRE, VENEZUELA

Use of *Clostridium perfringens* as an Indicator of Fecal Pollution in Areas of Bivalve Mollusks Aquaculture in Sucre State, Venezuela

Daniel Muñoz^{1*}, Crucita Graü de Marín², Luz Bettina Villalobos de Bastardo³, Hilda Marval², Carlos Martínez⁴ y Aracelis Zerpa²

¹Liceo Bolivariano "José Silverio González". ²Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas-INIA/Sucre-Nueva Esparta.

³Postgrado en Biología Aplicada, Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre. ⁴Liceo Bolivariano "Creación Tres Picos".
E-mail: *d_josem77@hotmail.com

RESUMEN

Se realizó un estudio asociado a la bio-acumulación de *Clostridium perfringens* y su relación con el grupo coliformes fecales (CF) y *E. coli* (Ec) en zonas productoras de mejillones del estado Sucre, Venezuela. Entre agosto 2005 y agosto 2006 se recogieron muestras de mejillones en tres zonas de producción (Ensenada La Chica, Bahía Iglesia y Punta Patilla). El Número Más Probable (NMP) de *C. perfringens* /g de mejillón se determinó mediante el método leche hierro, y las bacterias CF y Ec por el método señalado en Asociación Americana de Salud Pública (APHA, 1992). Se obtuvieron variaciones cuantitativas importantes en Ensenada La Chica con valores entre <3 a $9,3 \times 10^2$ NMP *C. perfringens* /g; los valores en Bahía Iglesia y Punta Patilla fluctuaron entre <3 a $2,0 \times 10^2$ y <3 a $7,1 \times 10$ NMP *C. perfringens* /g, respectivamente. La variación del NMP/g de CF y Ec fue: Ensenada La Chica CF: $4,0 \times 10^{-1}$, 1×10^4 y Ec: $4,0 \times 10^{-9}$, 3×10^2 . En Bahía Iglesia y Punta Patilla se observaron las concentraciones menos densas. Se observó una correlación positiva y significativa entre el grupo CF con *C. perfringens* ($r=0,41$, $P<0,01$). El análisis de varianza no reveló diferencias significativas entre meses ni entre estaciones en lo que respecta a la cuantificación de *C. perfringens*, lo que sugiere la existencia permanente de contaminación fecal. La utilización de *C. perfringens* como indicador de contaminación fecal podría ser ventajosa cuando se trata de calificar un área con potencial para la acuicultura, pero que pudiera estar altamente contaminada.

Palabras clave: *Clostridium perfringens*, moluscos bivalvos, coliformes fecales.

ABSTRACT

A study was performed associated to the bio-accumulation of *C. perfringens* and its relation with the fecal coliform group (CF) and *E. coli* (Ec), in zones of Sucre State where mussels are extracted. Between August 2005 and August, 2006, samples of mussels were gathered in three production zones (Ensenada La Chica, Bahía Iglesia and Punta Patilla). The Most Probable Number (MPN) of *C. perfringens* /g in the mussel was determined by the milk-iron method, and the bacteria CF and Ec by the method in American Public Health Association (APHA, 1992). Important quantitative variations were obtained in Ensenada La Chica with values between <3 to 9.3×10^2 NMP *C. perfringens* /g; values at Bahía Iglesia and Punta Patilla fluctuated between <3 to 2.0×10^2 and <3 to 7.1×10 NMP *C. perfringens* /g, respectively. The variation of NMP/g for CF and Ec in Ensenada La Chica for CF were 4.0×10^{-1} , 1×10^4 and for Ec 4.0×10^{-9} , 3×10^2 . Concentrations in Bahía Iglesia and Punta Patilla were less dense. A significant and positive correlation coefficient were observed between the CF Group and *C. perfringens* ($r=0.41$, $P<0.01$). An analysis of variance did not indicate significant differences between months or locations for *C. perfringens* concentration, which suggests the permanent presence of fecal pollution in the study areas. The use of *C. perfringens* could be advantageous as a fecal pollution indicator in order to characterize an area with potential for aquaculture but that could be highly contaminated.

Key words: *Clostridium perfringens*, bivalve mollusks, fecal coliforms.

INTRODUCCIÓN

La estimación de las bacterias del grupo coliformes y enterococos, en los cuerpos de agua, se ha utilizado a nivel mundial durante varias décadas como indicadores de su calidad bacteriológica [10, 11, 15, 22, 26, 50, 54]. En Venezuela se han seguido las tendencias internacionales en ese sentido, estableciéndose los límites permitidos en diferentes leyes y decretos [22, 43]. Sin embargo, pocos son los estudios donde se evalúe la utilidad de otros organismos indicadores y las técnicas más adecuadas para su cuantificación en los ambientes marinos, los cuales están destinados, ya sea para disfrute de la playa o la explotación de organismos asociados a estos ambientes, como lo son los moluscos bivalvos.

Los moluscos bivalvos son capaces de concentrar microorganismos en su interior debido a que se alimentan por mecanismos de filtración no selectiva y como consecuencia, pueden ser reservorios de patógenos [22]. Pudiendo acumular ciertos microorganismos de la familia Vibrionaceae, tales como: *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* [17, 25, 40], los cuales son patógenos para el humano. Por otro lado, si la zona de producción y cosecha está contaminada con materia de origen fecal pueden encontrarse en el interior de los bivalvos bacterias como *Salmonella* spp. [7, 29, 46], *Escherichia coli* patógenas [31], virus entéricos [3-5] y *Clostridium perfringens* [3, 4, 6, 54].

C. perfringens es un bacilo Gram positivo bastante grueso, recto, no posee cilios por lo tanto es inmóvil, anaerobio, capsulado; las esporas, muy raras de ver *in vitro*, son grandes, ovales, centrales o subterminales deformantes [28]. Se ha comprobado que esta especie causa una variedad de enfermedades de diferente severidad como la gangrena gaseosa, enteritis necrótica e intoxicaciones alimentarias [37, 45, 53].

C. perfringens produce un gran número de toxinas con actividades muy variadas. En base a la producción de cuatro toxinas letales mayores, han sido separados en cinco tipos, nombrados con las letras de la A a la E por Sterne y Warrack [52]. *C. perfringens* Tipo A, ocupa el tercer lugar entre los agentes etiológicos más comunes de intoxicación alimentaria [49, 53]. También es causa importante, en todo el mundo, de enterocolitis necrotizante en niños y adultos [19].

Numerosas investigaciones epidemiológicas han revelado que la mayoría de los brotes de enfermedades transmitidas por alimentos, en donde *C. perfringens* ha estado involucrado, ha sido por el consumo de productos cárnicos [36, 55] y productos avícolas [8, 12] que contienen gran número de células viables. Las células vegetativas esporulan al llegar al intestino delgado. Durante la formación de esporas se produce una potente enterotoxina que causa diarrea, la enfermedad tiende a ser moderada y los pacientes se recuperan, por lo general, a los 2 a 3 días de su inicio [28]. Los datos del Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos de Norte América (CDC, EUA) señalan que es

causante de un 5,4% de los brotes y un 16,6% de los casos de enfermedades son atribuibles al pescado, aunque es posible que muchos casos pasen desapercibidos y no reportados debido a que la enfermedad no es severa y no acuden a los hospitales [32].

En Venezuela, no existen reportes oficiales de la presencia de *C. perfringens* en zonas donde se lleva a cabo la cría o explotación de moluscos bivalvos. Por tal razón, y debido a las características que posee este anaerobio sulfito-reductor, se ha propuesto como indicador de contaminación de alto riesgo en el agua [1, 20, 39]. La ventaja más importante es que, sus esporas sobreviven en el agua mucho más tiempo que los organismos del grupo coliformes, y son resistentes a las condiciones ambientales. Las normas actuales [22, 43, 44] para evaluar la calidad microbiológica de áreas marinas para fines recreativos y cuerpos de agua destinados para la cría o explotación de moluscos bivalvos, se basan en el análisis de coliformes totales, coliformes fecales y *E. coli*, pero no incluyen una evaluación de la distribución y/o densidad de *C. perfringens*. Diversos autores [20, 21, 39, 41] han señalado a este microorganismo como una alternativa viable a los actuales indicadores de contaminación fecal.

Abeyta y col. [1] y Abeyta y Wetherington [2] discuten la utilización de *C. perfringens* como indicador de contaminación en las zonas de cultivo de moluscos, mediante su aislamiento por el procedimiento IMM (Iron Milk Method), ya que permite detectar contaminación fecal aún cuando los niveles de coliformes se encuentren bajos. Otros autores [4, 16, 54] han utilizado esta metodología reportando muy buenos resultados.

En la presente investigación, se realizó un estudio asociado a la utilización de *C. perfringens* como indicador alternativo de contaminación fecal y su relación con los bioindicadores convencionales como el grupo de coliformes fecales y *E. coli* en zonas productoras de mejillones del estado Sucre.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estaciones de muestreo

En el curso de un año, con una frecuencia mensual (agosto 2006 a agosto 2007), fueron colectadas muestras de mejillones en tres zonas de producción del estado Sucre, Venezuela (FIG. 1): Zona 1, Ensenada La Chica, ubicada en la costa sur del golfo de Cariaco (63°55'24" O y 10°27'28" N), figura como un centro de producción del mejillón marrón *Perna perna*, cuya cría se practica en plataformas flotantes (dos en total) de aproximadamente 6x4,5 m con 170 cuerdas trenzadas (cada balsa) de neumáticos, entre 6 y 7 m de largo cada una. Zona 2, Bahía Iglesia (10°42'47" N y 63°24'35" O) y Zona 3, Punta Patilla (10°41'19" N y 63°23'11" O) comprenden dos bancos naturales ubicados en la costa norte del estado, donde coexisten las especies de *P. perna* y *P. viridis*. Las muestras estaban conformadas por ejemplares de *P. viridis*.



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

Toma y procesamiento de las muestras

En cada zona de muestreo, se colectaron tres muestras de mejillones de unos 20 ejemplares en cada una. La longitud total mínima de cada mejillón fue de 8 cm, tal como lo especifica la Gaceta Oficial Nº 30.440, resolución 344 del 04 de julio de 1974 [43]. Los mismos fueron colocados en bolsas plásticas con cierre hermético. Se identificó cada bolsa con la fecha, hora y área de cosecha y fueron transportadas en cavas de aníme con hielo al laboratorio de microbiología del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA) Sucre/Nueva Esparta, donde se procesaron inmediatamente.

La preparación de los moluscos para el análisis, incluyó la limpieza de las valvas, remoción del contenido, mezclado y dilución de la muestra de acuerdo con lo recomendado por la Corporación Venezolana de Normas Industriales (COVENIN) [14]. Se pesaron 25 g de la carne del molusco para ser homogeneizados (Osterizer-Deluxe, Mod. 450, Venezuela) en 225 mL de agua peptonada (Merck) al 0,1%, y así obtener una dilución de 10^{-1} a partir de la cual se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-5} .

Análisis bacteriológicos

Recuento, aislamiento e identificación de *C. Perfringens*. Para la determinación del Número Más Probable (NMP) de *C. perfringens* por gramo de mejillón, se siguió la metodología de Abeyta y Wetherington [2]. A partir de las diluciones obtenidas en agua peptonada, se inocularon por triplicado tubos con 11 mL de leche pasteurizada y homogeneizada más 0,2 g de hierro en polvo. Previo a la inoculación el medio se esterilizó en autoclave (Wisconsin Aluminum-All American, Steroclave 25X, EUA) por 10 min a 10 libras de presión. Los tubos inoculados se incubaron (Memmert B30, Alemania) a 45°C por

18-20 h. La producción de fermentación tormentosa (coagulación rápida seguida de un fraccionamiento del coágulo y la formación de una masa esponjosa) se consideró una reacción positiva presuntiva. Se tomaron alícuotas de 0,1 mL y se procedió a inocular placas con agar base Triptosa-Sulfito-Cicloserina (TSC, Merck) en doble capa. A la capa basal se le adicionó el suplemento selectivo Shahidi-Ferguson-Perfringens (SFP, OXOID) y yema de huevo al 50%. Una vez sembradas por extensión se le colocó otra capa del agar previamente preparado sin yema de huevo, se incubaron en anaerobiosis utilizando jarras anaeróbicas (Fisher Scientific, Gaspack, BBL, EUA) a 37°C por 24 h. Las cepas con morfología y tinción de Gram compatibles con *C. perfringens* fueron identificadas bioquímicamente de acuerdo con la metodología y pruebas recomendadas por los mismos autores: inoculación en los medios lactosa-gelatina y nitrato-motilidad.

Determinación del número más probable de coliformes fecales y *E. coli* (NMP/g). De acuerdo a lo señalado por COVENIN [13], se realizaron siembras de 1 mL en tres tubos por dilución, que contenían caldo Lauryl Sulfato Triptosa (CLTS, Merck) y confirmando en caldo *Escherichia coli* (EC, Merck). Las colonias presuntivas se identificaron a través de pruebas bioquímicas convencionales [28, 38].

Análisis estadísticos

En cuanto a la evaluación estadística, los datos microbiológicos fueron transformados a logaritmo (base 10), para ser procesados estadísticamente mediante ANOVA, las diferencias significativas se comprobaron por una prueba *a posteriori* de Duncan. Por último, se aplicó un análisis de correlación entre cada uno de los grupos bacterianos estudiados. Todos los análisis se realizaron al 95% de significación según Sokal y Rohlf [51].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la TABLA I se presentan los valores promedios de *C. perfringens* para los diferentes sectores en las distintas campañas de muestreo. Como se observó, se obtuvo variaciones cuantitativas importantes: en Ensenada La Chica, el 75% de las muestras resultaron positivas, con recuentos entre $3-9,3 \times 10^2$ NMP/g. En Bahía Iglesia el 41,6% de las muestras fueron positivas, con valores promedios de $3-2,0 \times 10^2$ NMP/g. El 50% de las muestras de Punta Patilla resultaron positivas, con valores promedios entre $3-4,0 \times 10$ NMP/g.

La prevalencia relativamente alta encontrada en el presente estudio, resultó ser mayor a lo reportado por Saito [47], quien encuentra una incidencia de *C. perfringens* de 12%, en ostras del Japón. De igual modo, estudios realizados por Burrow [6] con mejillones en Turquía y por Villalobos y Elgueza-bal [54] con ostras del oriente de Venezuela reportan a *C. perfringens* en el 56 y 37% de las muestras analizadas, respectivamente.

Hasta el momento no se han establecido valores límites, estándares o normas que establezcan pauta acerca de la presencia de *C. perfringens*, para evaluar la calidad sanitaria de las zonas de crecimiento de los moluscos bivalvos. Sin embargo, se ha usado satisfactoriamente como indicador de contaminación fecal antigua en sistemas acuáticos [18, 30]. *C. perfringens*, ha mostrado correlación con la ocurrencia de patógenos en sistemas estuarinos [20] y ha mostrado además, ser el organismo indicador ideal en condiciones en las cuales la sobrevivencia es crítica, debido a su estabilidad extrema en el ambiente [4].

Burkhardt y col. [5] estudiaron en la almeja *Mercenaria mercenaria* la acumulación de microorganismos indicadores, incluyendo *E. coli*, *C. perfringens* y bacteriófagos, encontrando que la tasa de acumulación más grande la presentaron los bacteriófagos y *C. perfringens* superior a *E. coli* especialmente durante el verano, y sugieren, al igual que Gesche y col. [24] que podría ser una ventaja en la utilización como buen indicador de contaminación fecal.

El análisis de varianza no reveló diferencias estadísticamente significativas ($P > 0,05$) entre meses ni entre estaciones para el recuento de *C. perfringens*, lo que posiblemente demuestra la existencia permanente de contaminación fecal, presentando además tendencias similares de variación temporal y estacional.

Por otro lado, los coliformes han sido utilizados como indicadores sanitarios de la calidad del agua y también para clasificar las áreas de extracción de moluscos bivalvos, ya que éstos guardan una estrecha relación con el tipo de microorganismo presente en el agua donde crecen y se cosechan [29, 42]. Es por ello que en este estudio se realizaron análisis bacteriológicos enfocados hacia la determinación del índice de CF y *E. coli* (Ec) como un intento de correlacionar la concentración de *C. perfringens* con estos bioindicadores convencionales (TABLA I).

Se utilizó el requisito dado por el Ministerio de Agricultura y Cría (MAC) en la providencia administrativa N° 3 y 4, sobre condiciones sanitarias aplicables a los bivalvos vivos, y las normas para ejercer controles sanitarios y supervisión de la producción de los moluscos [35] y por la Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos de Norte América

TABLA I

RECuento DE *Clostridium perfringens*, COLIFORMES FECALES y *Escherichia coli* EN MEJILLONES PROCEDENTES DE TRES ÁREAS DE PRODUCCIÓN DEL ESTADO SUCRE, VENEZUELA / RECOUNT OF *Clostridium perfringens*, FECAL COLIFORMS AND *Escherichia coli* IN MUSSELS FROM THREE PRODUCTION GROUNDS OF SUCRE STATE, VENEZUELA

Meses	Recuento <i>C. perfringens</i> (NMP/g)			Recuento Colif. Fecal (NMP/g)			Recuento <i>E. coli</i> (NMP/g)		
	E.C	B.I	P.P	E.C	B.I	P.P	E.C	B.I	P.P
Agosto 2006	$4,5 \times 10^2$	0	0	$1,1 \times 10^4$	$4,0 \times 10$	$4,0 \times 10$	$2,8 \times 10^2$	$4,0 \times 10$	$4,0 \times 10$
Septiembre	4	0	0	$1,5 \times 10^2$	0	0	$1,5 \times 10^2$	0	0
Octubre	7	0	0	$4,5 \times 10^2$	0	0	$2,3 \times 10^2$	0	0
Noviembre	0	4	0	$4,5 \times 10^2$	$7,3 \times 10$	$4,0 \times 10$	$1,5 \times 10^2$	73	$4,0 \times 10$
Diciembre	0	0	4	$4,5 \times 10^2$	0	0	$4,5 \times 10^2$	0	0
Enero	0	0	0	$4,5 \times 10^2$	0	0	$1,5 \times 10^2$	0	0
Febrero	4	4	0	$9,3 \times 10^2$	$4,0 \times 10$	$4,0 \times 10$	$9,3 \times 10^2$	0	0
Marzo	4	$2,0 \times 10^2$	0	$2,3 \times 10^2$	$1,1 \times 10^4$	$4,0 \times 10$	9,1×10	$1,1 \times 10^4$	0
Abril	4	4	4	$2,3 \times 10^2$	$4,0 \times 10$	$7,3 \times 10$	9,1×10	0	$7,3 \times 10$
Mayo	$9,3 \times 10^2$	4	4	$3,9 \times 10^2$	$1,4 \times 10^2$	$1,4 \times 10^2$	$1,4 \times 10^2$	$7,3 \times 10$	$7,3 \times 10$
Julio	9	0	3	$4,0 \times 10$	$9,0 \times 10$	$9,0 \times 10$	$4,0 \times 10$	$9,0 \times 10$	$9,0 \times 10$
Agosto 2007	3	3	3	$1,5 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$	$1,5 \times 10^2$	$7,3 \times 10$	$9,1 \times 10$	$7,3 \times 10$

NMP/g: Número Más Probable/gramo. E.C: Ensenada La Chica. B.I: Bahía Iglesia. P.P: Punta Patilla.

(FDA, EUA) [22], según el cual los CF y Ec no deben exceder de 230 NMP/g. El 58% de las muestras procedentes de la Ensenada La Chica presentaron valores por encima del límite establecido, sobrepasando los criterios con respecto a los CF y en un 25% lo hacen con respecto a Ec; esto permite inferir que el molusco se está cosechando en aguas que presentan contaminación fecal directa [33, 46] por lo tanto podría resultar un producto potencialmente peligroso para su consumo directo.

Las zonas de Bahía Iglesia y Punta Patilla presentaron los niveles más bajos con respecto a los grupos bacterianos evaluados, cumpliendo con los criterios microbiológicos establecidos por la providencia administrativa Nº 4 del MAC y la FDA, valorándose su calidad sanitaria como satisfactoria para los niveles de contaminación fecal [25]. Sin embargo, en marzo 2007, se observó un valor superior ($1,1 \times 10^4$ NMP/g, común a los grupos bacterianos analizados) a los 230 NMP/g en la zona de Bahía Iglesia. Este incremento pudo deberse a corrientes de agua que hicieran resuspender material depositado en el fondo y permitiera circular por la zona el agua contaminada, lo que indicaría que realmente el agua de esta zona está siendo impactada de manera intermitente con aguas servidas de origen cloacal y la misma está siendo filtrada por los mejillones durante el proceso de alimentación normal del mismo [27].

El análisis de varianza detectó que hubo diferencias significativas en la enumeración de CF ($P < 0,05$) y EC ($P < 0,01$) entre estaciones, evidenciándose la formación de dos grupos homogéneos, un primer grupo integrado por Punta Patilla y Bahía Iglesia, que presentaron los valores más bajos, el segundo grupo formado por Ensenada La Chica quien tuvo los valores más altos (FIG. 2). Se observó que en la Ensenada La Chica, los impactos contaminantes, desde el punto de vista fecal, son más significativos y constantes, explicado este último por el hecho de que no se encontraron diferencias significativas entre los meses ($P > 0,05$), dándole más importancia a las posibles descargas que se originan en la zona.

La presencia de estos grupos indicadores de contaminación fecal en valores considerablemente altos, indica que la zona está siendo afectada por las aguas cloacales provenientes de las poblaciones cercanas al área de estudio. Cabe destacar que la descarga diaria de millones de litros de aguas residuales en los sistemas acuáticos semicerrados puede ser determinante en la calidad de sus aguas, especialmente en la época del año cuando disminuye la fuerza de los vientos y se producen condiciones de remanso, creándose zonas anóxicas en las partes más profundas [23]. Por su parte, Bahía Iglesia y Punta Patilla, al obtener los valores más bajos de densidad bacteriana, pudiera significar que las corrientes marinas hacen

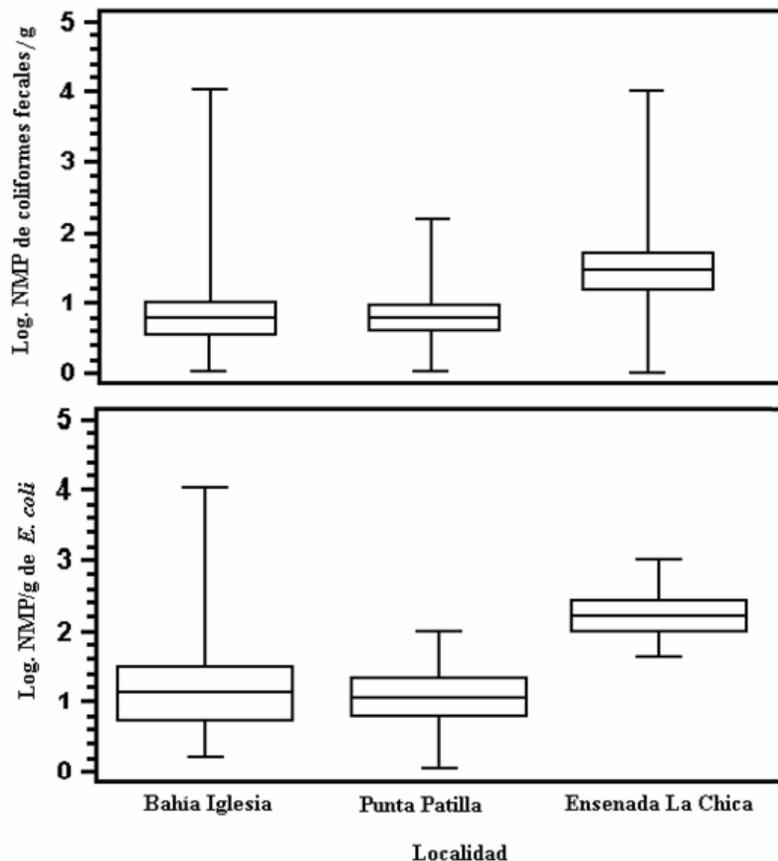


FIGURA 2. VALORES PROMEDIO DE COLIFORMES FECALES Y DE *Escherichia coli* PARA LAS ESTACIONES DE MUESTREO / AVERAGE VALUES OF FECAL COLIFORMS AND *Escherichia coli* FOR THE SAMPLING STATIONS.

que las posibles descargas puntualizadas no afecten estas zonas en la mayor parte del tiempo.

Por otra parte, es importante considerar la contribución del suelo y sedimento, adyacentes al área de crecimiento de los mejillones, como reservorios de bacterias coliformes durante los períodos de precipitación, como consecuencia de la escorrentía en la superficie de la tierra, arrastrando desechos domésticos y agrícolas a las costas [15, 26, 50].

La correlación entre CF y Ec en moluscos fue positiva y altamente significativa ($r=0,71$; $P<0,001$), de igual modo, se observó una correlación positiva y muy significativa entre el grupo CF con *C. perfringens* ($r=0,41$; $P<0,01$). La relación hallada entre CF con Ec y éstos mismos con *C. perfringens*, indicó que realmente el agua de las zonas estudiadas está siendo contaminada y la misma está siendo filtrada por los mejillones durante el proceso de alimentación normal de los mismos.

Al establecer una correlación entre CF con el recuento de *C. perfringens* ($r=0,41$; $P<0,01$) confirmaría que si bien *C. perfringens* es considerado indicador de contaminación fecal, éste se encuentra en menor cantidad que los coliformes. La menor correlación encontrada entre estos dos grupos bacterianos se puede atribuir a las diferentes características de supervivencia en estos ambientes, ya que *C. perfringens* por su carácter de esporulado soporta mejor los hábitats extraintestinales que los coliformes. Esta menor cantidad de *C. perfringens* en relación a los CF en las muestras analizadas, le atribuye una ventaja de uso como indicador cuando se trata de calificar un área que pudiera estar altamente contaminada [9, 24, 48].

En un estudio realizado por Burkhardt y Calci [4] señalaron que la bioacumulación de este microorganismo en moluscos bivalvos no parece estar influenciado por las condiciones ambientales (temperatura, salinidad) o cambios estacionales, en este estudio previo la tasa de acumulación de *C. perfringens* fue 245 veces más alta que los coliformes, y llegaron a la conclusión de que el mismo puede servir como centinela para determinar si una zona de cosecha de moluscos bivalvos ha sido afectada por disposición de excretas.

Villalobos y Elguezabal [54] señalaron que, si bien los virus representan otra alternativa, su poca durabilidad en las aguas, así como lo laborioso de su aislamiento e identificación, no los hacen tan buenos indicadores. Es por ello preferible escoger un indicador como *C. perfringens* que puede demostrar que la contaminación de origen fecal fue reciente o lejana en el tiempo, que realmente su hábitat no es el marino y es de fácil numeración, aislamiento e identificación. En este sentido, Miller y col. [34] menciona que, si bien es cierto que los moluscos bivalvos se alimentan por filtración, acumulando bacterias fecales que fluyen de los suelos a los cuerpos de agua, se manifiesta una relación entre los efectos antropogénicos y los ecosistemas costeros, acentuándose en este último nichos bacterianos complejos y dinámicos que pudieran estar ya adaptándose a los ecosistemas marinos, como es el caso del grupo coliformes.

Los rangos de variación que presentan las concentraciones de los grupos bacterianos registrados en las tres áreas de estudio se corresponde con la variabilidad habitual que presentan estos indicadores, determinada en gran parte, por los cambios continuos que se producen en las condiciones ambientales y las propias variaciones de las cargas contaminantes que se introducen en las áreas de cosecha de los moluscos [42].

Sin obviar esta variabilidad, lo que evidencian los resultados obtenidos es la capacidad de los moluscos de concentrar bacterias presentes en el agua circundante, aunado a una posible relación estacional entre los parámetros ambientales (temperatura, salinidad, entre otros), al aumento del agua por efecto de las lluvias y vertidos y la influencia de las corrientes [25, 33, 42]. Factores que inciden en un intercambio pronunciado entre el cuerpo de agua, los sedimentos con grandes contenidos de materia orgánica y los microorganismos que se distribuyen con mayor homogeneidad en la columna de agua.

De acuerdo con lo mencionado por Lisle y col. [30] y Byamukama y col. [9], en ambientes con baja variación física, el uso simultáneo de *E. coli* y *C. perfringens* permite diferenciar si la contaminación fecal es reciente o antigua. En el presente estudio el recuento de *C. perfringens* fue bajo en relación con los CF lo cual indica que en las zonas estudiadas existe contaminación fecal reciente que se ha hecho constante en el tiempo.

CONCLUSIONES

El uso de anaerobios como *C. perfringens* para determinar la calidad sanitaria en los moluscos bivalvos, debe ser tomado en consideración ya que son excelentes indicadores de una contaminación fecal reciente o lejana en el tiempo y no son parte de la microflora de ambientes marinos.

La menor correlación encontrada ($r=0,41$; $P<0,01$) entre CF con el recuento de *C. perfringens* le atribuye una ventaja de uso como indicador cuando se trata de calificar un área con potencial para la acuicultura que pudiera estar altamente contaminada.

El recuento de *C. perfringens* fue bajo en relación con los CF, lo cual indica que en las zonas estudiadas existe contaminación fecal antigua que se ha hecho constante en el tiempo.

El bivalvo *Perna perna*, en Ensenada la Chica, está siendo cosechado en aguas con una probable fuente de contaminación fecal y no cumple con las normas vigentes para la enumeración de CF y *Ec*. en este tipo de alimento.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ABEYTA, C.; WEKELL, M. M.; KAYSNER, C.; STOTT, R.; RAGHUBEER, E. Media Evaluation and behavior of *Clostridium perfringens* as an adjunct indicator of quality

- in shellfish growing areas. **Water Sci. and Technol.** 20 (6-7): 63-70. 1988.
- [2] ABEYTA, C.; WETHERINGTON, J. The use of Iron Milk Method for recovering *Clostridium perfringens* from shellfish. Food and Drug Administration. Seafood Product Research Center. Bothell, Washington, U.S.A. Laboratory Information Bulletin. 5 pp. 1990.
- [3] BEURET, C.; BAUMGARTNER, A.; SCHLUEP, J. Virus-contaminated oysters: a three-month monitoring oysters imported to Switzerland. **Appl. Environ. Microbiol.** 69 (4): 2292-2297. 2003.
- [4] BURKHARDT, W.; CALCI, K. Selective accumulation may account for shellfish associated viral illness. **Appl. Environ. Microbiol.** 66(4): 1375-1378. 2000.
- [5] BURKHARDT, W.; WATKINS, W.; RIPPEY, S. Seasonal effects on accumulation of microbial indicator organisms by *Mercenaria mercenaria*. **Appl. Environ. Microbiol.** 58 (3): 826-831. 1992.
- [6] BURROW, H. *Clostridium perfringens* contamination of chilled sea fish and mussels in Turkey. **Archiv. Fuer. Lebensmittelhygiene.** 25: 39-42. 1974.
- [7] BRANDS, D.; INMAN, A.; GERGA, C.; MARÉ, J.; BILLINGTON, S.; SAIF, L.; LEVINE, J.; JOENS, L. Prevalence of *Salmonella* spp. in oysters in the United States. **Appl. Environ. Microbiol.** 71 (2): 893-897. 2005.
- [8] BRYNESTAD, S.; GRANUM, P.E. *Clostridium perfringens* and foodborne infections. **Int. J. Food Microbiol.** 74: 195- 202. 2002.
- [9] BYAMUKAMA, D.; MACH, R.; KANSIIME, F.; MANAFI, M.; FARNLEITNER, A. Discrimination efficacy of fecal pollution detection in different aquatic habitats of a high-altitude tropical country, using presumptive coliforms, *Escherichia coli*, and *Clostridium perfringens* spores. **Appl. Environ. Microbiol.** 71:65-71. 2005.
- [10] BLANCO, H.; NORDELO, M.; EXPOSITO, N.; VARGAS, B. Coliformes en medios marinos de áreas protegidas con presencia significativa de aves: ¿indicadores de contaminación? caso de estudio: Parque Nacional Archipiélago los Roques. **Rev. Fac. Ing. UCV.** 19 (1): 21-27. 2004.
- [11] CARUSO, G.; MAIMONE, G.; MANCUSO, M.; MODICA, A.; GENOVESE, L. Microbiological controls across the productive cycle of *Dicentrarchus labrax* L. and *Sparus aurata* L.: a study from the environment to the final product. **Aquacult. Res.** 35 (2): 184-193. 2004.
- [12] ÇAKMAK, O.; SEDA, F.; MUHITTIN, T.; ÜRFAN, E. Presence and contamination level of *Clostridium perfringens* in raw frozen ground poultry and poultry burgers. **Turk. J. Vet. Anim. Sci.** 30: 101-105. 2006.
- [13] COVENIN (1104-96). **Determinación del Número Más Probable de coliformes, coliformes fecales y de E. coli.** Comisión Venezolana de Normas Industriales. Ministerio de Fomento, Caracas. 20 pp. 1996.
- [14] COVENIN (1126-89). **Alimentos. Codificación y preparación de muestras para el análisis microbiológico.** Comisión Venezolana de Normas Industriales. Ministerio de Fomento, Caracas. 7 pp. 1989.
- [15] CORTÉS-LARA, M. Importancia de los coliformes fecales como indicadores de contaminación en la franja litoral de la Bahía de Banderas, Jalisco-Nayarit. **Rev. Biomed.** 14: 121-123. 2003.
- [16] CRAVEN, S. Occurrence of *Clostridium perfringens* in the Broiler Chicken Processing Plant as Determined by Recovery in Iron Milk Medium. **J. Food Protect.** 64 (12): 1956-1960. 2001.
- [17] DEPAOLA, A.; NORDSTROM, L.; BOWERS, J.; WELLS, J.; COOK, D. Seasonal abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Alabama oysters. **Appl. Environ. Microbiol.** 69 (3): 1521-1526. 2003.
- [18] EDWARDS, D.; MCFETERS, G.; VENKATESAN, I. Distribution of *Clostridium perfringens* and fecal sterols in a benthic coastal marine environment influenced by the sewage outfall from McMurdo station, antártica. **Appl. Environ. Microbiol.** 64 (7): 2596-2600. 1998.
- [19] EFUNTOYE, M.; ADETOSOYE, A. Sporadic diarrhea due to *Clostridium perfringens* in children aged five years and below. **African J. Biotech.** 3(7): 366-369. 2004.
- [20] FERGUSON, C.; COOTE, B.; ASHBOLT, N.; STEVENSON, I. Relationships between indicators, pathogens and water quality in an estuarine system. **Water Res.** 30 (9): 2045-2054. 1996.
- [21] FUJIOKA, R. Monitoring coastal marine waters for spore-forming bacteria of faecal soil origin to determine point from non-point pollution. **Water Sci. and Technol.** 44 (7): 181-188. 2001.
- [22] FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (F.D.A.). Sanitation of shellfish growing areas. National Shellfish Sanitation Program. Manual of operations. Part. 1. U.S. Dep. of Health and Human Services. Public Health Service. Washington, D.C., U.S.A. 550 pp. 1990.
- [23] FLORES, C. Actualidad y perspectiva del espacio marino costero con énfasis en la realidad venezolana. **Bol. Inst. Oceanogr. Venez. Univ. Oriente.** 38 (1): 110-118. 1999.
- [24] GESCHE, E.; VALLEJOS, A.; SAEZ, M. Eficiencia de anaerobios sulfito-reductores como indicadores de calidad sanitaria de agua. Método del Número Más Probable (NMP). **Arch. Med. Vet.** 35 (1): 99-107. 2003.

- [25] GRAÜ DE M., C.; LA BARBERA, A.; ZERPA, A.; SILVA, S.; GALLARDO, O. Aislamiento de *Vibrio* spp. y evaluación de la condición sanitaria de los moluscos bivalvos *Arca zebra* y *Perna perna* procedentes de la costa nororiental del estado Sucre, Venezuela. **Rev. Científ. FCV-LUZ**. XIV (6): 513-521. 2004.
- [26] HERRERA, A.; SUAREZ, P. Indicadores bacterianos como herramientas para medir la calidad ambiental del agua costera. **Intercien**. 30 (3): 171-176. 2005.
- [27] IRIARTE, M.; RENGEL, A. Bacterias indicadoras de calidad sanitaria en la ostra de mangle *Crassostrea rhizophorae* y en el agua de la Laguna de Las Marites, Isla de Margarita, Venezuela. **Mem. Soc. Cienc. Nat. La Salle**. 148: 93-108. 1997.
- [28] KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.N.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN, W.C. Bacterias anaeróbicas. In: **Diagnóstico Microbiológico**. Lippincott Company. 278-299 pp. 1999.
- [29] LEGNANI, P.; LEONI, E.; VILLA, G.C. Microbiological monitoring of mussels and clams collected from the shellfish growing marine areas in Rimini Province. **Ann. Ig. Med. Prev. Comunita**. 14 (2): 105-113. 2002.
- [30] LISLE, J.; SMITH, J.; EDWARDS, D.; MCFETERS, G. Occurrence of Microbial Indicators and *Clostridium perfringens* in Wastewater, Water Column Samples, Sediments, Drinking Water, and Weddell Seal Feces Collected at McMurdo Station, Antarctica. **Appl. Environ. Microbiol.** 70(12): 7269-7276. 2004.
- [31] MARTÍNEZ, R.; VILLALOBOS, L. *Escherichia coli* enteropatógena en moluscos crudos y cocidos. **Rev. Científ. FCV-LUZ**. XV (2): 163-167. 2005.
- [32] MARTÍNEZ, A. Riesgos microbiológicos asociados al consumo de moluscos bivalvos. **Memorias del taller venezolano sobre aprovechamiento y comercialización de moluscos bivalvos**. Universidad de Oriente, noviembre, Isla de Margarita. 36-45 pp. 1999.
- [33] MARTÍNEZ, C.; GRAÜ DE M., C.; VILLALOBOS DE B., L. B.; MUÑOZ, D.; ZERPA, A. Calidad microbiológica del guacuco *Tivela mactroides* y del agua en Playa Guiria, estado Sucre, Venezuela. LIV Convención Anual ASOVAC. **Acta Cient. Venez.** 55 (Supl. 1): 178. 2004.
- [34] MILLER, W.; MILLER, M.; GARDNER, I.; ATWILL, E.; BYRNE, B.; JANG, S.; HARRIS, M.; AMES, J.; JESSUP, D.; PARADIES, D.; WORCESTER, K.; MELLI, A.; CONRAD, P. *Salmonella* spp., *Vibrio* spp., *Clostridium perfringens*, and *Plesiomonas shigelloides* in marine and freshwater invertebrates from coastal California ecosystems. **Microb. Ecol.** 52 (2): 198-206. 2006.
- [35] MINISTERIO DE AGRICULTURA Y CRÍA (MAC), Servicio Autónomo de los Recursos Pesqueros y Acuícolas-SARPA. Providencia N° 3 del 18-03-98: Normas para ejercer controles sanitarios y supervisión de la producción de moluscos bivalvos. Providencia N° 4 del 18-03-98: Condiciones sanitarias aplicables a los moluscos bivalvos vivos. Gaceta Oficial 36.429 del 6-4-98. Caracas, D.F. Venezuela. 303.927 pp. 1998.
- [36] MOHAMMAD, A.; DANIEL, Y.; FUNG, C. Occurrence of *Clostridium perfringens* in ground beef and ground turkey evaluated by three methods. **J. of Food Safety**. 11 (3): 197-203. 2007.
- [37] MCCLANE, B.A.; ROOD, J.I.; BAHL, H.; DURRE, P. Clostridial toxins involved in human enteric and histotoxic infections. In: **Clostridia: Biotechnology and Medical Application**. Ed. Bahl, H. 169-209 pp. 2001.
- [38] MAC FADDIN, J. **Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica**. Editorial Panamericana. Buenos Aires-Argentina. Manual. 301 pp. 1980.
- [39] PAUL, J.; ROSE, J.; JIANG, S.; KELLOGG, C.; SHINN, E. Occurrence of fecal indicator bacteria in surface water and the subsurface aquifer in Key Largo, Florida. **Appl. Environ. Microbiol.** 61 (6): 2235-2241. 1995.
- [40] PAPAPOPOULOU, C.; ECONOMOU, E.; ZAKAS, G.; SALAMOURA, C.; APOSTOLOU, L. Microbiological and pathogenic contaminants of seafood in Greece. **J. of Food Qual.** 30 (1): 28-42. 2007.
- [41] PORTONI, B.; DIXON, B.; DANIELSON, R. An evaluation of *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* and *Bacteroides vulgatus* as indicators of fecal pollution in shellfish growing waters. 5th International Conference on Proceeding of aquaculture, San Diego, Julio 6-9 U.S.A. 15-16pp. 1995.
- [42] PUENTE, A.; JUANÉS, J.; REVILLA, J.; ÁLVAREZ, C.; GÓMEZ, J.; GARCÍA, A. 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. **Bol. Inst. Esp. Oceanog.** 18 (1-4): 67-73. 2002.
- [43] REPÚBLICA DE VENEZUELA, Gaceta Oficial N° 30.440. Ministerio de Agricultura y Cría (MAC). Resolución N° 344. Extraordinario del 04-07-1974. **Normas para actividades de captura, transporte y comercialización de moluscos bivalvos desde los centros y/o sitios de recolección**. Caracas, D. F. Venezuela. 4 pp. 1974.
- [44] REPÚBLICA DE VENEZUELA, Gaceta Oficial N° 5.021 Extraordinario, del 18-12-1995. Decreto 883 del 11-10-95. **Normas para la clasificación y el control de la calidad de los cuerpos de agua y vertidos o efluentes líquidos**. Caracas, D.F. Venezuela. 4pp. 1995.

- [45] SALMERÓN, A.; PRAVIA, M.; GARCÍA, M. Sepsis fulminante por *Clostridium perfringens* en una paciente previamente sana. **Emerg.** 12: 133-137. 2000.
- [46] SARCOS, M.; BOTERO, L. Calidad microbiológica de la almeja *Polymesoda sólida* recolectada en playas del Municipio Miranda del estado Zulia. **Cienc.** 13 (1): 34-43. 2005.
- [47] SAITO, M. Production of enterotoxin by *Clostridium perfringens* derived from humans, animals, foods and the natural environment in Japan. **J. Food Prot.** 53 (2): 115-118. 1990.
- [48] SKANAVIS, C.; YANKO, W. *Clostridium perfringens* as a potential indicator for the presence of sewage solids in marine sediments. **Marine Pollut. Bull.** 42 (1): 31-35. 2001.
- [49] SMITH-DEWAAL, C.; HICK, G.; BARLOW, K.; ALDER-TON, L.; VEGOSEN, L. Foods associated with food-borne illness outbreaks from 1990 through 2003. **Food Protect. Trend.** 26 (7): 466-473. 2006.
- [50] SILVA, A.; VIEIRA, R.; MENEZES, F.; FONTELES-FILHO, A.; TORRES, R.; SANTANNA, E. Bacteria of fecal origin in mangrove oysters *Crassostrea rhizophorae* in the Cocó River estuary, Ceará State, Brazil. **Braz. J. Microbiol.** 35 (1-2): 126-130. 2004.
- [51] SOKAL, R.; ROHLF, F. **Biometria: principios y métodos estadísticos en la investigación biológica.** W.H. Freeman and company. San Francisco. U.S.A. 779 pp. 1981.
- [52] STERNE, M.; WARRACK, H. The types of *Clostridium perfringens*. **J. Pathol. Bact.** 88: 279-281. 1964.
- [53] TANAKA, D.; ISOBE, J.; HOSOROGI, S.; KIMATA, K.; SMIMIZU, M.; KATORI, K.; GYOBU, Y.; NAGAI, Y.; YAMAGISHI, T.; KARASAWA, T.; NAKAMURA, S. An outbreak of food-borne gastroenteritis caused by *Clostridium perfringens* carrying the *cpe* gene on a plasmid. **Jpn. J. Infect. Dis.** 56: 137-139. 2003
- [54] VILLALOBOS, L.; ELGUEZÁBAL, L. Microbiological quality of the bivalve *Pinctada imbricata* commercialized in Cumaná, Venezuela. **Acta Cient. Ven.** 52 (1): 55-61. 2001.
- [55] WONG-MC CLURE, R.; SILVA-SOLORZANO, A.; BADILLA-VARGAS, X. Intoxicación alimentaria por *Clostridium perfringens* en el centro penitenciario de atención institucional de San José. Estudio de cohorte retrospectivo. **AMC.** 46 (2): 78-83. 2004.