

# ENUMERACIÓN DE AERÓBIOS MESÓFILOS, COLIFORMES FECAL Y *Clostridium perfringens* EN LA OSTRA *Crassostrea rhizophorae* PROCEDENTE DE LAGUNA GRANDE DEL OBISPO, ESTADO SUCRE, VENEZUELA

Enumeration of Mesophilic Aerobics, Faecal Coliforms and *Clostridium perfringens* in the Oyster *Crassostrea rhizophorae* from Laguna Grande del Obispo, Sucre State, Venezuela

Mayelys González<sup>1</sup>, Luz Bettina Villalobos<sup>1</sup>, Aleikar Vásquez-Suárez<sup>2</sup>, Crucita Graü<sup>3</sup> y Humberto Gil<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biología, Universidad de Oriente (UDO), Núcleo de Sucre. <sup>2</sup> Centro de Investigaciones en Ciencias de la Salud, UDO, Núcleo de Anzoátegui. <sup>3</sup> Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA-Sucre/Nva. Esparta).  
E-mail: mayelysg@hotmail.com

## RESUMEN

La ostra *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828), típica de lagunas costeras del Caribe y Brasil es capaz de concentrar microorganismos en su interior, al alimentarse por mecanismos de filtración no selectiva, representando un reservorio de patógenos al humano que acostumbra a consumirlas en forma cruda. Por tal motivo, se evaluó mensualmente, entre agosto 2005 y julio 2006, la calidad microbiológica del bivalvo procedente de tres estaciones del banco natural Laguna Grande del Obispo, estado Sucre, Venezuela. Los máximos valores del recuento en placas para aerobios mesófilos (AM) se observaron en octubre 2005 para las estaciones 1 y 3 ( $4,70 \times 10^6$  y  $4,60 \times 10^6$  UFC/g, respectivamente). El número más probable (NMP/g) de coliformes fecales (CF) sobrepasó los límites máximos permitidos (3,0 NMP/g) por la legislación sanitaria venezolana y la Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos (FDA). Se detectó *Clostridium perfringens* tipo A, mostrando sus valores más altos ( $2,4 \times 10^4$ ) en la estación 1 y 3 durante mayo 2006, siendo la única especie que presentó diferencias significativas (KW= 13,8637 P<0,001) entre las estaciones de muestreo. Las enterobacterias más abundantes y frecuentes en *C. rhizophorae* fueron *Escherichia coli* (34%), *Proteus mirabilis* (12%) y *Enterobacter cloacae* (12%). Las fluctuaciones en los cambios anuales de temperatura (23-31°C), salinidad (32-40 UPS) y oxígeno disuelto medidos *in situ* en el agua de mar (2,94-5,88 mg/L de O<sub>2</sub>) fueron características de aguas costeras tropicales, los cuales no permitieron

evidenciar correlación alguna con los grupos bacterianos estudiados. Estos microorganismos han estado implicados en brotes de enfermedades transmitidas por alimentos causando problemas gastrointestinales, por lo que de acuerdo a los resultados obtenidos, la prevalencia de estas bacterias en *C. rhizophorae* refleja un alto riesgo para la salud del consumidor.

**Palabras clave:** *Crassostrea rhizophorae*, bivalvo, *Clostridium perfringens* tipo A.

## ABSTRACT

The mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) commonly found in lagoon systems of the Caribbean and Brazil shores are capable of concentrating microorganisms due to their feeding nonselective filtering mechanisms, representing a pathogen bacterial reservoir of high risk for human eating raw oyster. For this reason, between August 2005 and July 2006, the microbiological quality of this bivalve from three stations of the natural bed Laguna Grande del Obispo, Sucre State, Venezuela, were assessed monthly. The maximum values of mesophilic aerobics (MA) plate counts were observed during October 2005 in both stations 1 and 3 ( $4.70 \times 10^6$  and  $4.60 \times 10^6$  CFU/g, respectively). The most probable number (MPN/g) of faecal coliforms (FC) exceeded the permitted limit (3.0 MPN/g) by Venezuelan Health Legislation and the Food and Drug Administration in the U.S.A. (FDA). *Clostridium perfringens* type A was detected, showing significant differences (KW=13.8637; P<0.001) between stations sampling, with highest values ( $2.4 \times 10^4$ ) during May 2006 in station 1 and 3. The abundant and frequent Enterobacteriaceae species in *C. rhizo-*

*phorae* were *Escherichia coli* (34%), *Proteus mirabilis* (12%) and *Enterobacter cloacae* (12%). Fluctuations in annual changes of temperature (23-31°C), salinity (32-40 PSU) and dissolved oxygen in seawater (2.94-5.88 mg/L O<sub>2</sub>) measured *in situ* were characteristics of tropical coastal waters, which did not allow to find correlation with bacterial groups studied. These microorganisms have been implicated in outbreaks of foodborne illness causing gastrointestinal problems, so according to the results, the prevalence of these bacteria in *C. rhizophorae* reflects a high risk to consumer health.

**Key words:** *Crassostrea rhizophorae*, bivalve, *Clostridium perfringens* type A.

## INTRODUCCIÓN

La ostra de mangle *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) es un molusco bivalvo típico de las lagunas costeras del Caribe y Brasil. Su hábitat principal son las raíces del mangle rojo *Rhizophorae mangle*, a las que se fija permanentemente formando racimos. Se reproduce durante todo el año, pero con mayor intensidad desde junio hasta mediados de diciembre, coincidiendo con el aumento en la temperatura del agua, factor que, en conjunto con la disponibilidad de alimento, parece regular la reproducción [16].

La comercialización de este recurso pesquero es realizada de forma informal, en las playas con mayor potencial turístico ofreciéndolas (crudas) a turistas o visitantes directamente en la concha. Tomando en consideración la alta carga bacteriana presente en los moluscos bivalvos cabe mencionar que no hay un control sanitario constante por parte de los vendedores que garanticen la inocuidad del producto durante todo el año, ya que al parecer solamente se realizan las pruebas de toxicidad durante los días próximos a la Semana Santa [14].

Actualmente, gran parte de la población mundial considera a los productos del mar como una alternativa más saludable que las carnes rojas [37]. Sin embargo, desde el punto de vista de salud pública han sido involucrados en innumerables brotes de toxiinfecciones alimentarias y se consideran vectores importantes en la transmisión de enfermedades entéricas, debido a que su consumo se realiza crudo o parcialmente cocido [17]. La amplia gama de enfermedades transmitidas a consecuencia del consumo de moluscos marinos se debe a las diferentes bacterias patógenas presentes en dichos alimentos, las cuales pueden ser divididas en bacterias autóctonas y alóctonas. Dentro de las autóctonas se tienen aquellas bacterias ampliamente distribuidas en ambientes acuáticos, entre las cuales se puede mencionar los miembros de la familia Vibrionaceae [9] listerias [15] y clostridios que además han estado relacionados con brotes de enfermedades de origen alimentario [28]. Mientras que los coliformes totales (CT) y fecales de la familia Enterobacteriaceae son algunos representantes alóctonos que son incorporados al agua a partir de animales o humanos infectados [37] y han

sido utilizados como indicadores de contaminación fecal en aguas costeras [19] y alimentos marinos [30].

El género *Clostridium* está formado por un grupo heterogéneo de bacilos Grampositivos anaerobios esporulados [45]; capaces de producir infecciones de origen exógeno y endógeno. En la actualidad se han descrito más de 150 especies, aunque sólo alrededor de 30 han sido asociadas con infección humana, siendo *C. perfringens* la especie más frecuente. Esta especie produce diversas toxinas, las cuales juegan un papel importante en la patogenicidad de enfermedades y son clasificadas en cinco biotipos (A, B, C, D, E); basado en su habilidad de producir las toxinas alfa, beta, epsilon e iota. Los distintos biotipos de *C. perfringens* están asociados con diferentes enfermedades, por ejemplo, la cepa tipo C ha sido reportada como causante de enterotoxemias y enteritis necrótica en bovinos (*Bos taurus*), porcinos (*Sus scrofa domesticus*) y aves (*Gallus gallus*, *Meleagris gallopavo*, *Anas platyrhynchos domesticus*;) mientras que la cepa tipo D es causante de disenteria en corderos y enfermedades renales en ovejas y corderos (*Ovis musimon*) [42]. La cepa tipo A ha sido asociada con gangrena gaseosa y alimento contaminado en humanos [21].

Tomando en cuenta la alta explotación, amplia comercialización y consumo de la ostra de mangle procedente de Laguna Grande del Obispo, se llevó a cabo un estudio para verificar la calidad microbiológica de la misma, ya que ésta es considerada un recurso alimenticio de gran importancia en las poblaciones aledañas a las zonas costeras.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Recolección y preparación de las muestras

Mensualmente se colectaron en las raíces de mangles, ejemplares de *C. rhizophorae* ( $n = 110 \pm 10$  por estación) entre agosto 2005 y julio 2006 en tres estaciones de la Laguna Grande del Obispo, ubicada en la costa noreste del golfo de Cariaco, estado Sucre, Venezuela. La estación 1 localizada entre los 10°35'15" N y 64°02'06" O, la estación 2 se ubicó a 10°35'41" N y 64°01'26" O y la estación 3, a 10°35'41" N y 64°01'44" O.

Las muestras fueron transportadas en cavas con hielo hasta el laboratorio, en donde se desbullaron bajo estrictas condiciones de asepsia, de acuerdo a lo recomendado por Miescer y col. [31].

Para los análisis microbiológicos se siguieron las pautas recomendadas por COVENIN [6], en los que se determinaron aeróbios mesófilos (AM) siguiendo la norma COVENIN [7]. La determinación de los coliformes fecales (CF) se realizó por medio de la técnica de fermentación de tubos múltiples con caldo Lauryl Sulfato Triptosa (Merck) de acuerdo a las recomendaciones de la APHA [2] y la norma COVENIN [5].

Para diferenciar los CF, se procedió a tomar una asada de los tubos con gas en caldo Lauryl Sulfato Triptosa para ino-

cular tubos con 10 mL de caldo para *Escherichia coli* (EC, Merck) y un tubo Durham. Los resultados fueron llevados a la tabla del número más probable (NMP) de APHA [2] para expresarlos como NMP de bacterias CF por gramo de ostra mientras que en la identificación y recuento de *C. perfringens* se utilizó el método leche hierro (Iron Milk Method, IMM) recomendado por Abeyta y col. [1].

### Determinación de los parámetros físico-químicos

En cada una de las estaciones se hicieron mediciones *in situ* de temperatura y oxígeno disuelto (YSI, Inc., Yellow Springs, Ohio; modelo 55/12 ft, EUA.), mientras que la salinidad se midió con ayuda de un refractómetro (Atago Co. Ltd, modelo ATC-S/Mill-E, Japón).

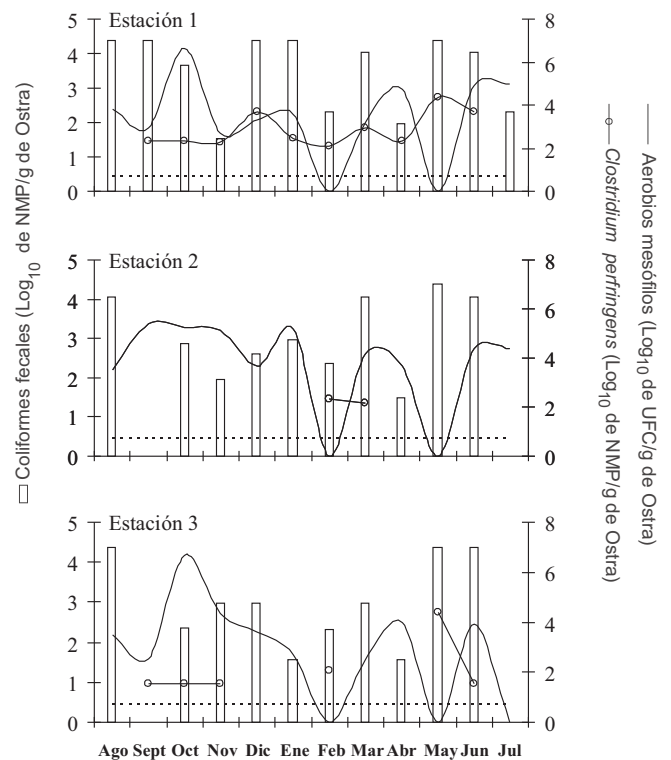
### Análisis estadístico

Se aplicó una prueba no paramétrica Kruskal-Wallis para determinar si existían diferencias significativas en el recuento bacteriano por meses y estaciones. Además se realizó un análisis de correlación de rango (Spearman) para verificar las posibles relaciones entre los parámetros físico-químicos con el recuento bacteriano [41].

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las muestras de *C. rhizophorae* presentaron los mayores márgenes de variación para los aerobios mesófilos (FIG. 1) en las estaciones 1 y 3, con valores de  $0-4,70 \times 10^6$  y  $0-4,60 \times 10^6$  UFC/g, respectivamente, ambos con máximos durante octubre 2005, mientras que en la estación 2 el mayor recuento de aerobios ( $2,57 \times 10^5$  UFC/g) fue hallado en septiembre 2005. Durante febrero y mayo 2006, no se detectó la presencia de estos microorganismos en ninguna de las estaciones, al igual que en julio 2006 para la estación 3. A pesar de las variaciones en las densidades del grupo bacteriano en cuestión, no se encontraron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) entre la carga de aerobios mesófilos presentes en las ostras colectadas de las tres estaciones ni tampoco entre los meses muestreados. Las bacterias aerobias mesófilas representan una medida menos precisa y fiable del peligro de intoxicación alimentaria a diferencia de otros indicadores. Los recuentos elevados de estas bacterias en productos crudos o no tratados, a menudo están constituidos por la microflora normal que dependen principalmente de óptimas temperaturas, disponibilidad de oxígeno y calidad del agua donde se desarrollan los moluscos para su crecimiento.

En Venezuela no existe alguna normativa que regule las concentraciones de aerobios mesófilos en alimentos marinos, sin embargo, internacionalmente la Comisión Internacional en especificaciones Microbiológicas para Alimentos (ICMSF), siglas del inglés International Commission on Microbiological Specifications for Food, establece como límite máximo permitido  $10^6$  UFC/g [22]. Las ostras analizadas en este estudio pre-



**FIGURA 1. RECuento DE AEROBios MESóFiloS (LíNEA CONTINUA), COLIFORMES FecALES (BARRAS) Y *C. perfringens* (Círculos) EN MUESTRAS DE *C. rhizophorae*. COLECTADAS EN TRES ESTACIONES DE LAGUNA GRANDE DEL OBISPO. LA LíNEA PUNTEADA INDICA EL LíMITE PERMITIDO DE COLIFORMES FecALES (CF).**

sentaron promedios anuales de  $4,1 \times 10^5$ ;  $6,7 \times 10^4$  y  $3,9 \times 10^5$  UFC/g en las estaciones 1, 2 y 3, respectivamente, sobrepasando el límite antes mencionado sólo durante el mes de octubre 2005 en las estaciones 1 y 3. Estos valores superan los reportados en *Pinctada imbricata* y *Crassostrea virginica* [43, 45].

Los coliformes fecales (FIG. 1), en la estación 1 presentaron el mayor promedio anual del NMP por gramo de ostra  $1,23 \times 10^4$  ( $\text{Log}_{10} = 4,089$ ), mientras que en las estaciones 2 y 3, se obtuvieron promedios de  $0,50 \times 10^4$  ( $\text{Log}_{10} = 3,70$ ) y  $0,63 \times 10^4$  ( $\text{Log}_{10} = 3,80$ ), respectivamente. De forma general, con excepción de septiembre 2005 y julio 2006, en las estaciones 2 y 3 en las que no se detectó CF, los valores elevados de este grupo bacteriano fueron relativamente constantes durante el tiempo de muestreo, evidenciándose los máximos durante agosto 2005 en las estaciones 1 y 3; en septiembre y diciembre 2005 y enero 2006 sólo para la estación 1; en mayo 2006 en las tres estaciones y junio sólo en la estación 3, estos resultados permitieron demostrar la existencia de diferencias significativas entre los meses, pero no entre las estaciones. Las cantidades

de estas enterobacterias presentes en las muestras del bivalvo superan los 3,0 NMP/g de ostra ( $\text{Log}_{10}$  0,48) el cual representa el límite máximo permitido por el Ministerio de Agricultura y Cría [32] en las providencias administrativas N° 03 y 04 y por la Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos [13] para la aceptación de moluscos bivalvos destinados a ser consumidos crudos.

Algunas bacterias presentes en moluscos se encuentran asociadas a contaminación fecal por lo que representan una amenaza para la salud mediante su consumo; dentro de este grupo se encuentran los CF, los cuales son indicadores eficientes de la calidad sanitaria, aunque su presencia, no necesariamente indica la existencia de agentes patógenos [34] en muestras de agua o alimentos marinos. Por otro lado, algunos patógenos, cuando están presentes en moluscos y otros productos marinos frescos cultivados, usualmente se encuentran en niveles relativamente bajos, sin embargo, el adecuado tratamiento de los mismos mediante cocción, no asegura su inocuidad [10].

Durante el primer y último mes de muestreo, no se detectó la presencia de *C. perfringens* en las ostras obtenidas de las tres estaciones (FIG.1), sin embargo, la estación 1 y 3 presentaron la mayor frecuencia de aparición de esta especie, ambas con máximos valores de  $2,4 \times 10^4$  NMP por gramo de ostra durante mayo 2006, mientras que en la estación 2, la presencia de este grupo bacteriano sólo se observó en los meses de febrero y marzo 2006 con valores de  $2,1$  y  $1,4 \times 10^2$  NMP/g, respectivamente. Las pruebas estadísticas permitieron detectar la existencia de diferencias altamente significativas ( $P < 0,05$ ) en las concentraciones de *C. perfringens* presentes en las ostras analizadas de las tres estaciones; sin embargo, entre los meses de muestreo no se encontraron diferencias significativas.

*C. perfringens* no es exclusivamente de origen fecal y posiblemente, debido a su carácter de sulfito reductor, puede proceder de otras fuentes ambientales, incluyendo sedimentos marinos, vegetación en descomposición como los manglares [23], ambientes terrestres y aguas contaminadas [20]. Sus concentraciones en el agua son inferiores a las de coliformes y estreptococos, no obstante, aguas carentes de estos últimos grupos bacterianos y con presencia de *Clostridium* spp. proveen información sobre el tiempo de contaminación. Su capacidad para formar esporas le confiere resistencia a elevadas temperaturas, desecación, pH extremos, falta de nutrientes, entre otras condiciones ambientales adversas por lo que se han propuesto como indicadores de contaminación bacteriana, además de indicar el riesgo de sobrevivencia de agentes patógenos en ecosistemas marinos, expuestos a contaminación fecal remota [4]. Todo esto pudiera explicar la presencia de *C. perfringens* en las muestras analizadas, sin embargo, la no detección de este microorganismo durante agosto 2005 y julio 2006, así como en las estaciones analizadas durante varios meses de muestreo no asegura la ausencia de la especie en

el área de estudio, ya que muchas bacterias pueden encontrarse en estado viable, pero no cultivable, con una fisiología cambiante en función de las condiciones ambientales [27] o estar presentes en los sedimentos que luego son resuspendidos por fuerzas naturales o antrópicas y posteriormente filtrados por los moluscos.

Mediante el análisis realizado se pudo contrastar que el 83,33% de las muestras analizadas procedentes de la estación 1 resultaron positivas en *C. perfringens*, seguido de la estación 3 y 2 con 50 y 16,67%, respectivamente. Estos resultados coinciden con los de Muñoz y col. [33] en *Perna* spp. quienes reportan 60% de muestras con positividad para *C. perfringens*, mientras que Villalobos y Elguezabal [45], reportaron en *P. imbricata* 3% de positividad para este microorganismo en muestras del bivalvo no manipuladas. A diferencia de los CF y *E. coli*, la resistencia en ambientes extremos, ha sido una de las causas que no ha permitido establecer un número estándar para utilizar las densidades celulares de *C. perfringens* como indicadores de calidad sanitaria de moluscos, crustáceos o aguas para cultivo de éstos. En esta investigación, se demuestra que la acumulación de *C. perfringens* en *C. rhizophorae* no estuvo influenciada por las condiciones ambientales estudiadas o por los cambios temporales, sin embargo, debido a que esta bacteria es altamente acumulada por las ostras, la concentración presente en el agua pudiera indicar si una zona ostrícola, ha sido impactada por aguas residuales. Desafortunadamente, los elevados porcentajes de acumulación de este microorganismo, hacen que su utilidad en la determinación de la magnitud del impacto, sea meramente especulativa [3].

Los elevados valores de *C. perfringens* en las estaciones 1 y 3 pudieran estar vinculados con descargas de aguas residuales a partir de poblaciones cercanas y a las precipitaciones, que arrastran gran cantidad de bacterias y materia orgánica. De acuerdo a estos resultados es posible inferir que los nutrientes y la materia orgánica aportada por las lluvias a los sistemas costeros son aprovechados por la comunidad bacteriana, razón por la cual las bacterias sulfito-reductoras suelen ser abundantes en el medio marino, ya que este tipo de ambiente es un gran reservorio de compuestos de azufre y, al haber un incremento de materia orgánica, estos microorganismos se ven favorecidos [26].

Por otra parte, en esta investigación no se observó ninguna correlación entre la presencia y cantidad de los microorganismos estudiados en las muestras de ostras, concordando con lo expuesto por Griffin y col. [18], quienes mencionan que los CF pueden vivir en ambientes acuáticos por largo tiempo, especialmente en moluscos, y que los mismos tienen poca o ninguna relación con patógenos humanos. Además señalan la sobreestimación en el número de CF por adición de grupos bacterianos del género *Klebsiella*, los cuales pueden ser erróneamente contabilizados como CF. A pesar de esto, no deja de ser motivo de preocupación la presencia de algunos grupos bacterianos identificados en los moluscos analizados.

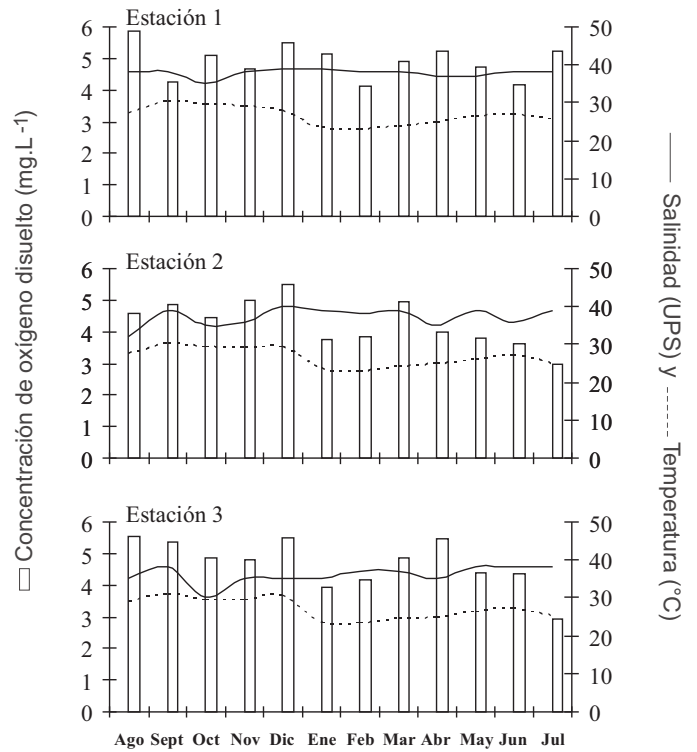
Los miembros de la familia Enterobacteriaceae se llaman microorganismos entéricos porque con suma frecuencia residen en el aparato digestivo de animales y humanos, aunque muchas especies también se encuentran en el agua. En esta investigación el mayor porcentaje de aislamiento lo presentó *E. coli* (34%) seguido de *Proteus mirabilis* (12%) y *Enterobacter cloacae* (12%), y la menor proporción estuvo representada por *P. vulgaris*, *Citrobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Serratia marcescens*, *S. rubidaea* y *Serratia* spp., todas éstas con 3% (FIG. 3). La poca frecuencia de estas especies durante el estudio posiblemente se deba a sus bajas concentraciones, sin embargo, su presencia constituye una señal de alerta ya que puede estar vinculada con la incidencia de infecciones en la población debido a que generalmente son aisladas en humanos [24, 25]. Estos resultados son similares a los presentados por Papadopoulou y col. [36], quienes determinaron los contaminantes microbiológicos y patogénicos de alimentos marinos, reportando a *Escherichia coli* y *Proteus* spp. como las especies que se aislaron con mayor frecuencia, permitiendo sugerir sobre el contacto directo de las ostras analizadas con un cuerpo de agua que posee una importante microflora alóctona con posible origen sedimentario y a partir de agua residuales [39] o de escorrentías [11].

**Parámetros físico-químicos del agua**

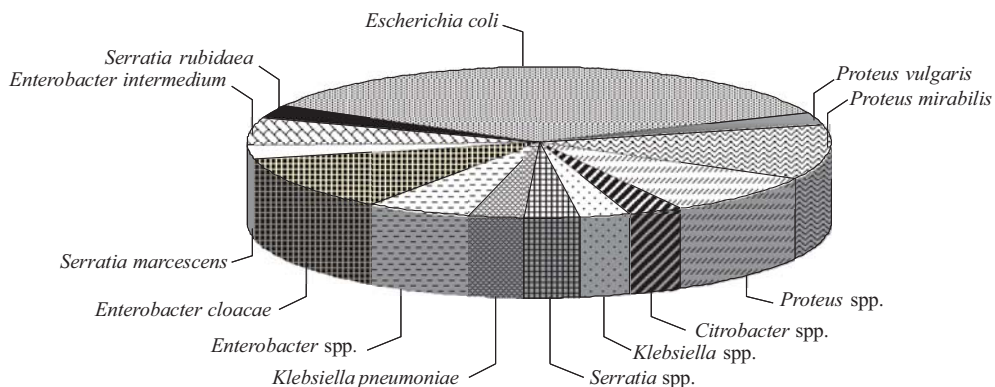
Las aguas costeras pueden ser vistas como sistemas de transición influenciados por elementos que varían temporalmente, presentando una dinámica ambiental caracterizada por ligeros cambios en la salinidad, concentración de nutrientes, turbiedad y temperatura.

De acuerdo a las variaciones térmicas, en este estudio se definieron dos períodos, uno con las temperaturas más altas entre agosto y diciembre 2005 (con intervalos entre 27 – 31°C), que se corresponden con la época de lluvias y otro con las temperaturas más bajas a partir de enero de 2006 (23 – 27°C), relacionados con la época de sequía (FIG. 2). Las menores temperaturas observadas a partir de enero pueden ser debido a la alta intensidad de los vientos alisios, lo que permite la renova-

ción de la columna de agua, donde las aguas más frías y ricas en nutrientes, de gran importancia en la producción primaria fitoplanctónica, ascienden hasta la superficie, lo cual se pudo evidenciar por la reaparición en la superficie de los 23°C, posiblemente por efectos de la surgencia.



**FIGURA 2. VARIACIÓN MENSUAL DE LA SALINIDAD (LÍNEA CONTINUA), TEMPERATURA (LÍNEA PUNTEADA) Y OXÍGENO DISUELTTO (BARRAS), EN EL AGUA DE TRES SITIOS DE EXTRACCIÓN DE LA OSTRA *C. rhizophorae*, EN LAGUNA GRANDE DEL OBISPO.**



**FIGURA 3. PREVALENCIA DEL GRUPO ENTEROBACTERIACEAE EN LAS MUESTRAS ANALIZADAS DE *Crassostrea rhizophorae* PROVENIENTES DE LAGUNA GRANDE DEL OBISPO.**

Las altas temperaturas reflejadas a partir del mes de agosto, pueden ser producto de las altas radiaciones solares percibidas por este cuerpo de agua, que a su vez está relacionada con los meses de calma, debido a que durante esos meses se observó una fuerte estabilidad de la columna de agua por la poca intensidad de los vientos y el cese de las surgencias. Estos resultados coinciden con los reportados por De Grado y Bashirullah [8].

El menor margen de variación en la salinidad durante el período de muestreo se observó en la estación 1 (35-39 UPS), con máximos durante los meses de diciembre 2005 y enero 2006, seguido de la estación 2 con un rango de variación entre 32 y 40 UPS, con su valor mayor en diciembre de 2005, mientras que la estación 3 presentó variaciones entre 30 y 38 UPS, con su valor más alto durante los meses de septiembre 2005, mayo, junio y julio 2006 (FIG. 2). La disminución de la salinidad del agua de las tres estaciones pudo ser producto de la entrada de aguas frescas más profundas provenientes del golfo de Cariaco, que a su vez se ven favorecidas por procesos hidrodinámicos y por los mecanismos de mezclas que tienen lugar en la zona por efecto eólico, mientras que el incremento de esta variable puede atribuirse a la alta evaporación, como resultado de la intensa radiación solar que incide en la región. Resultados similares fueron descritos por Ferraz-Reyes y col. [12].

Las concentraciones de oxígeno disuelto (FIG. 2) mostraron elevadas variaciones durante todo el período de muestreo, observándose en la mayoría de los meses y en todas las estaciones, valores inferiores al estándar permitido (5 mg/L de O<sub>2</sub>) en la Gaceta Oficial N° 5021-95 con respecto a la clasificación de aguas. Las concentraciones de oxígeno encontradas en esta investigación son similares a las reportadas por De Grado y Bashirullah [8]. Según Okuda y col. [35], la penetración de aguas subsuperficiales, tanto de la Fosa como del golfo de Cariaco, hacia el interior de las capas profundas de Laguna Grande permite una disminución del contenido de oxígeno en las capas profundas de más de 10 ó 15 m. Los bajos niveles en la concentración de oxígeno de las diferentes estaciones, también pueden ser un indicativo de la alta carga contaminante del efluente orgánico, el cual sirve como sustrato energético para el desarrollo y crecimiento bacteriano [40].

Se pudo observar una falta de correlación entre los AM, CF y *C. perfringens* con los parámetros ambientales estudiados, comportamiento que puede ser consecuencia de las ligeras fluctuaciones ambientales durante el período de estudio, las cuales caracterizan las aguas costeras tropicales [38], que a diferencia de otras latitudes, se ven influenciadas por marcados cambios en la temperatura, concentración de oxígeno disuelto y salinidad del agua de mar a consecuencia de efectos estacionales, repercutiendo sobre las cargas bacterianas de productos marinos [44]. Posiblemente, las variaciones temporales en la flora bacteriana pudiera estar más relacionada con disponibilidad de nutrientes aportados por los fenómenos de surgencia y las aguas de escorrentías apoyando lo expuesto

por Griffin y col. [18]. Por otro lado, Maffei y col. [29] afirman sobre la relación entre calidad microbiológica del bivalvo *Chamelea gallina* y las condiciones ambientales donde éste se desarrolla, atribuyendo las variaciones de la carga bacteriana del molusco a eventos meteorológicos que influyen sobre los ríos y consecuentemente en la calidad microbiológica del agua de mar. En cualquiera de los casos, la condición filtradora de algunos moluscos, representa un factor que incrementa el riesgo de contraer enfermedades por consumo de alimentos marinos poco tratados, debido a que las ostras pueden acumular organismos patógenos en niveles superiores a los presentes en el agua, pudiendo causar intoxicaciones o infecciones a humanos.

## CONCLUSIONES

En las muestras de ostras se pudo apreciar que sólo para el mes de octubre del 2005, en las estaciones 1 y 3 se excedió el límite establecido para los aerobios mesófilos, mientras que los CF fueron excedidos en casi la totalidad de los muestreos.

La presencia de *C. perfringens* en algunos de los meses muestreados indican la variabilidad en la calidad microbiológica de *C. rhizophorae* y además refleja el origen de una contaminación fecal relativamente lejana en el tiempo.

No se evidenció correlación alguna en el recuento de los diferentes grupos bacterianos encontrados en *C. rhizophorae* ni entre los parámetros ambientales estudiados.

La prevalencia de CF, *C. perfringens* y otras bacterias enteropatógenas detectadas en *C. rhizophorae* reflejan riesgo para la salud del consumidor habitual de este tipo de alimento.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ABEYTA, C.; MICHALOVSKIS, A; WEKELL, M. Differentiation of *Clostridium perfringens* from related Clostridia in iron milk medium. **J. Food Prot.** 48: 130.134. 1985.
- [2] AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). Compendium of methods for the microbiological examination of food. Vanderzant, C. y Splittatoesser, DF. (Eds.). Washington, D.C., U.S.A. 1134 pp. 1992.
- [3] BURKHARD, W.; CALCI, K. Selective accumulation may account for shellfish-associated viral illness. **Appl. Environ. Microbiol.** 66 (4): 1375-1378. 2000.
- [4] CHO, J.; CHO, H.; KIM, S. Heavy contamination of a subsurface aquifer and a stream by livestock wastewater in a stock farming area, Wonju, Korea. **Environ. Poll.** 109: 137-146. 2000.
- [5] COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). Norma COVENIN: 1104-96. Alimentos. Determinación del número más probable de coliformes, coliformes fecales y de *E. coli*. 2<sup>da</sup> Rev. Comisión Vene-

- zolana de Normas Industriales. Ministerio de Fomento. Caracas. Venezuela. 12 pp. 1996.
- [6] COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). Norma COVENIN: 1126-89. Alimentos. Codificación y preparación de muestras para el análisis microbiológico. 1<sup>era</sup> Rev. Comisión Venezolana de Normas Industriales. Ministerio de Fomento. Caracas, Venezuela. 7 pp. 1989.
- [7] COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). Norma COVENIN: 902-87. Alimentos. Método para recuento de microorganismos aerobios mesófilos en placas de Petri. Comisión Venezolana de Normas Industriales. Ministerio de Fomento. Caracas, Venezuela. 7 pp. 1987.
- [8] DE GRADO, A.; BASHIRULLAH, A. Algunos atributos de la estructura comunitaria de la ictiofauna de la Laguna Grande del Obispo, Golfo de Cariaco, Venezuela. **Acta Cient. Ven.** 52: 3-13. 2001.
- [9] DEPAOLA, A.; KAYSNER, C.; BOWERS, J.; COOK, D. Environmental investigations of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters after outbreaks in Washington, Texas & New York (1997-1998). **Appl. Environ. Microbiol.** 66(11): 4649-4654. 2000.
- [10] FELDHUSEN, F. The role of seafood in bacterial foodborne diseases. **Microb. and Infect.** 2(13):1651-1660. 2000.
- [11] FERNÁNDEZ-DELGADO, M.; CONTRERAS, M.; GARCÍA-AMADO, M. A.; GUENEAU, P.; SUÁREZ, P. Occurrence of *Proteus mirabilis* associated with two species of venezuelan oysters. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.** 49(6): 355-359. 2007.
- [12] FERRAZ-REYES, E.; MANDELLI, E.; REYES, V. G. Fitoplancton de la Laguna Grande del Obispo, Venezuela. **Bol. Inst. Oceanog. Venez. Univ. Oriente.** 26(1-2): 111-124. 1987.
- [13] FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (F.D.A). Sanitation of the harvesting, processing and distribution of shellfish. National shellfish sanitation program. Manual of operations. Part. II. Dep. of Health and Human Services. Public Health Service. Food and Drug Administration, Washington, D.C. U.S.A. 40 pp. 1990.
- [14] GIL, H.; MORENO, M. Explotación y comercialización de la ostra de mangle, *Crassostrea rhizophorae*, en algunas playas turísticas del estado Sucre, Venezuela. **Zoot. Trop.** 25(3): 215-219. 2007.
- [15] GÖKSOY, E.; KIRKAN, S.; KAYA, O. Comparison of polymerase chain reaction and conventional methods for the diagnosis of *Listeria monocytogenes* in stuffed mussels. **Turk J. Vet. Anim. Sci.** 30: 229-234. 2006.
- [16] GÓMEZ, A. *Crassostrea rhizophorae*. **Los recursos marinos renovables del Estado Nueva Esparta, Venezuela.** Organizaciones Gráficas Capriles, C.A. Caracas, Venezuela. 208 pp. 1999.
- [17] GRAÜ DE M, C.; ZERPA, A. Evaluación de la calidad microbiológica de la pepitona *Arca zebra* en la zona de Chacopata Península de Araya. **Bol. Inst. Oceanog. Venez. Univ. Oriente.** 38(1): 42-43. 1999.
- [18] GRIFFIN, D. W.; LIPP, E. K.; MCLAUGHLIN, M. R.; ROSE, J. B. Marine recreation and public health microbiology: quest for the ideal indicator. **BioScien.** 51(10): 817-825. 2001.
- [19] HERRERA, A.; SUÁREZ, P. Indicadores bacterianos como herramientas para medir la calidad ambiental del agua costera. **Intercien.** 30: 171-176. 2005.
- [20] HUGHES, K.; THOMPSON, A. Distribution of sewage pollution around a maritime Antarctic research station indicated by faecal coliforms, *Clostridium perfringens* and faecal sterol markers. **Environ. Poll.** 127(3): 315-321. 2004.
- [21] JOHNSON, S.; GERDING, D. N. Enterotoxaemic infections. In: **The clostridia: molecular biology and pathogenesis.** Rood, J. I.; McClane, B. A.; Songer, J. G.; Tittball, R. W. (Eds.) London: Academic Press. 40-117 pp. 1997.
- [22] JONES, T.; PAVLIN, B.; LAFLEUR, B.; INGRAM, L.; SCHAFFNER, W. Restaurant inspection scores and foodborne disease. **Emerg. Infect. Dis.** 10: (4) 688-692. 2004.
- [23] JUN-BIN, L.; YUE-QIN, CH.; CHONG-YU, L.; NORA, F.; QI-JIE, Z.; LI-NAN, H. Recovery of novel bacterial diversity from mangrove sediment. **Mar. Biol.** 150: 739-747. 2007.
- [24] KACMAZ, B.; SULTAN, N. *In vitro* Susceptibilities of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. to ampicillin-Sulbactam and amoxicillin-clavulanic acid. **Jpn. J. Infect. Dis.** 60: 227-229. 2007.
- [25] KUO-CHEN, C.; YIN-CHING, C.; LII-TZU, W.; GUANCHENG, H.; WEN-LIANG, Y. Clinical Experiences of the infections Caused by extended-Spectrum B-lactamase-producing *Serratia marcescens* at a Medicak Center in Taiwan. **Jpn. J. Infect. Dis.** 59: 147-152. 2006.
- [26] LENGELER, J. W.; DREWS, G.; SCHLEGEL, H. G. Anaerobic Energy Metabolism. In: **Biology of the Prokaryotes.** Blackwell. Stuttgart, Alemania. 955 pp. 1999.
- [27] LLEO M.; SIGNORETTO, C.; CANEPARI, P. Gram-Positive Bacteria in the Marine Environment. In: **Oceans and Health: Pathogens in the Marine Environment.** Belkin, S.; Colwell, R. (Eds.) Springer, New Cork. Pp 307-330. 2005.
- [28] LOH, J.; LIU, Y.; CHEW, S.; ONG, E.; FAM, J.; NG, Y.; TAYLOR, M.; OOI, E. The rapid identification of *Clostridium perfringens* as the possible aetiology of a diarrhoeal outbreak using PCR. **Epidemiol. Infect.** 136: 1142-1146. 2008.

- [29] MAFFEI, M.; VERNOCCHI, P.; LANCIOTTI, R. ; GUERZONI, M. E. ; BELLETTI, N. ; GARDINI, F. Depuration of Striped Venus Clam (*Chamelea gallina* L.): Effects on Microorganisms, Sand Content, and Mortality. **Food Microbiol. Saf.** 74: 1-6. 2009.
- [30] MARTÍNEZ, R. E.; VILLALOBOS, L. B. *Escherichia coli* enteropatógena en moluscos crudos y cocidos. **Rev. Científ. FCV-LUZ.** XV(2): 163-167. 2005.
- [31] MIESCER, J. J.; HUNT, D. A.; REDMAN, J.; SALINGO, A.; LUCAS, J. P. Molluscan Shellfish, Oyster, Mussels and Clams. In: Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Vanderzant, C.; Splittstroesser, D. F. (Eds). 3<sup>er</sup> Ed. American Public Health Association (APHA). Pp 897-918. 1992.
- [32] MINISTERIO DE AGRICULTURA Y CRÍA (MAC). Servicio Autónomo de los Recursos Pesqueros y Acuicola-SARPA. Providencia Nº 3 del 18-03-98: Normas para ejercer controles sanitarios y supervisión de la producción de moluscos Bivalvos. Providencia Nº 4 del 18-03-98: Condiciones sanitarias aplicables a los moluscos bivalvos vivos. En: Gaceta Oficial 36 429 del 06-04-98. Caracas, D.F. Venezuela. Pp. 303-927. 1998.
- [33] MUÑOZ, D; GRAÜ DE M, C.; VILLALOBOS DE B, L. B.; MARTÍNEZ, C.; ZERPA, A. Indicadores bacterianos en los mejillones *Perna perna* (Linné, 1758) y *P. viridis* (Linné, 1758) y en aguas de extracción de bivalvos procedentes de la costa norte y sur del estado Sucre, Venezuela. **Rev. Científ. FCV-LUZ,** XVIII (5): 595-606. 2008.
- [34] NGUZ, K.; SHINDANO, J.; SAMAPUNDO, S.; HUYGHEBAERT, A. Microbiological evaluation of fresh-cut organic vegetables produced in Zambia. **Food Contr.** 16: 623-628. 2005.
- [35] OKUDA, T.; BENÍTEZ, J.; GARCÍA, A.; FERNÁNDEZ, E. Condiciones hidrográficas y químicas en la Bahía de Mochima y la Laguna Grande del Obispo desde 1964 a 1966. **Bol. Inst. Oceanog. Venez. Univ. Oriente.** 7(2): 7-37. 1968.
- [36] PAPADOPOULOU, C.; ECONOMOU, E.; ZAKAS, G.; SALAMOURA, C.; DONTOROU, C.; APOSTOLOU, J. Microbiological and pathogenic contaminants of seafood in Greece. **J. Food Qual.** 30: 28-42. 2007.
- [37] PEREIRA, F.; GUERRA, M.; BERNARDO, F. Natural occurrence of *Vibrio* spp. y *Listeria monocytogenes* in molluscan shellfish in Portugal. **J. Shellf. Res.** 20(3): 1229-1233. 2001.
- [38] PRIETO, A.; MONTES, A.; RUIZ, L. Potencial de producción de biomasa en una población natural de la ostra *Crassostrea rhizophorae*, en la Laguna Grande de Obispo, Golfo de Cariaco, Venezuela. **Intercien.** 33(10): 747-753. 2008.
- [39] SATO, M. I. Z.; MONTEIRO, C. K.; STOPPE, N. C.; SÁNCHEZ, P. S.; OSTINI, S.; MATTÉ, G. R. Shellfish and marine water microbiological quality. **Environ. Toxicol. and Water Qual.** 7: 95-105. 2006.
- [40] SEGOVIA, J.; DELGADILLO, F.; OROZCO, M.; MUÑOZ, A.; CANINO, S. Distribución de DBO y bacterias en la costa fronteriza México-EUA. **Cien. Mar.** 21(4): 415-426. 1995.
- [41] SOKAL, R.; ROHLF, F. Biometry. The principles and practice of statistics in biological research. In: **Multiway analysis of variance.** Freeman, W. (Ed.). New York. 887 pp. 1995.
- [42] SONGER, J. G. Clostridial enteric diseases of domestic animals. **Clin. Microbiol. Rev.** 9: 34-216. 1996.
- [43] TÉLLEZ, S. J.; OLIVA, M.; RAMÍREZ DE L, J. A.; VÁZQUEZ, M. Evaluación de la calidad microbiológica del ostión de "La Laguna Madre" de Tamaulipas (México) **Cienc. Tecnol. Aliment.** 2(3): 152-157. 1999.
- [44] VERNOCCHI, P.; MAFFEI, M.; LANCIOTTI, L.; SUZZI, G.; GARDINI, F. Characterization of Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*) harvested in Adriatic Sea (Italy). **Food Cont.** 18:1575-83. 2007.
- [45] VILLALOBOS, L.; ELGUEZABAL, L. Microbiological quality of the bivalve *Pinctada imbricata* commercialized in Cumaná, Venezuela. **Acta Cient. Ven.** 52(1): 55-61. 2001.