

"EVALUACIÓN DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE MEJILLÓN (*Mytilus galloprovincialis*) DEPURADO"

"Microbiological quality of depurated mussels (*Mytilus galloprovincialis*)"

María Carmen López-Mendoza*, Santiago Alonso-Sousa y Cristina Alapont-Gutiérrez

Departamento de Producción y Sanidad Animal, Salud Pública Veterinaria y Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad CEU Cardenal Herrera. C/ Tiranto lo Blanc nº 7. 46115. Alfara del Patriarca (Valencia), España. *Autor para correspondencia. Tfno: +34 961369000. Fax: +34 961395272. E-mail: clopez@uchceu.es

RESUMEN

El mejillón mediterráneo (*Mytilus galloprovincialis*), al igual que todos los moluscos bivalvos, se alimenta por filtración, por lo que concentra los virus y bacterias de las aguas en las que habita. Esto puede suponer un riesgo alimentario para los consumidores. Por eso, en función de la contaminación del agua de procedencia, se somete a un proceso de depuración, que habitualmente se controla utilizando *Escherichia coli* como microorganismo indicador. El objetivo de este estudio fue conocer la calidad microbiológica de mejillones de diversos orígenes una vez depurados y valorar la utilidad de *Clostridium perfringens* como indicador de contaminación en este producto. Para ello se analizaron 15 lotes de mejillones de diferentes zonas de producción de España e Italia, en los que se realizaron los recuentos de microorganismos aerobios mesófilos, Enterobacterias, *E. coli*, *Vibrio* spp., *Listeria monocytogenes* y *Cl. perfringens*, y se investigó la presencia de *Salmonella* spp. Los resultados mostraron la presencia de *Salmonella* spp. en cuatro de los lotes investigados y de *Cl. perfringens* en trece de los lotes, a pesar de que todos ellos cumplían los límites exigidos en la legislación para *E. coli*. En conclusión, basándose en los resultados obtenidos, parece que el uso de *E. coli* como microorganismo indicador en el proceso de depuración de los mejillones, no es suficiente para asegurar la calidad microbiológica del producto. Así, podría ser recomendable tener en cuenta a otros microorganismos, como *Cl. perfringens*, para controlar tanto el proceso de depuración como la calidad microbiológica del producto final, tras su depuración. Finalmente los resultados obtenidos evidencian la necesidad de realizar un cocinado adecuado de este alimento, que permita la destrucción de los microorganismos presentes.

Palabras clave: *Mytilus galloprovincialis*; *Salmonella* spp.; *Clostridium perfringens*; bivalvos.

ABSTRACT

Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) is a species of bivalve mollusk that has a high capacity in filtering the water nearby and concentrate the virus and bacteria present in it. This can constitute a microbiological risk when they are consumed afterwards. Thus, depending on water pollution, mussels suffer a depuration process, usually controlled using *Escherichia coli* as indicator. The aim of this study was to determine the microbiological quality of mussels from various sources after purifying, and to consider the utility of the use of *Clostridium perfringens* as quality indicator. For this, microbiological analysis were performed in fifteen lots of mussel samples obtained from Spain and Italy. Aerobic mesophilic microorganisms, *Enterobacteriaceae*, *E. coli*, *Vibrio* spp., *Listeria monocytogenes*, *Cl. perfringens*, and the presence *Salmonella* spp. were measured. The results showed the presence of *Salmonella* spp. in four batches of mussels from various locations and *Cl. perfringens* in thirteen of them. All samples were within the legal limits for *E. coli*. In conclusion, the results propose that the use of *E. coli* as an indicator microorganism for the mussels' depuration process is not sufficient to assure the microbiological quality of the product. Thus, it would be appropriate to include of *Cl. perfringens*, as an additional indicator, in the control carried out during and after the refinement is done. Finally, the results emphasized the necessity to properly cook this food product prior to consumption, as it allows the destruction of any microorganisms present.

Key words: *Mytilus galloprovincialis*; *Salmonella* spp.; *Clostridium perfringens*; bivalves.

INTRODUCCIÓN

El mejillón del mediterráneo (*Mytilus galloprovincialis*) es una especie de molusco bivalvo de elevado consumo en España y otros países europeos como Italia y Francia. El mejillón, al igual que todos los moluscos bivalvos, concentra los virus y bacterias de las aguas en las que habita, debido a que se alimenta por mecanismos de filtración no selectiva [2, 10]. Así, su microbiota es un reflejo del agua donde se ha capturado o cultivado [27]. Entre los microorganismos que se pueden encontrar en estos moluscos, destacan aquellos que forman parte de la biota natural del medio marino, como los géneros *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas* o *Vibrio*, y los microorganismos fecales, que tienen su origen en las aguas residuales que llegan al mar, como *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Shigella* o los virus entéricos [28]. Además, los moluscos bivalvos suelen consumirse crudos (como la ostra) o poco cocinados (como el mejillón), lo que no asegura la destrucción de la biota presente, que en muchos casos es patógena. Por esta razón la calidad microbiológica de este producto es de gran importancia, pudiendo constituir un riesgo potencial para la salud del consumidor [34].

Actualmente, en la Unión Europea, las zonas marítimas en las que se producen o extraen moluscos bivalvos se clasifican legalmente en función de los recuentos de *E. coli* que se obtengan en los bivalvos de la zona, según el Reglamento (CE) 854/2004 [4]. En función de esta contaminación, se podrán consumir directamente (recuentos de *E. coli* \leq 230 número más probable (NMP/100 gramos (g) de carne y líquido intravalvar) o deberán ser sometidos a un proceso de depuración (recuentos de *E. coli* $>$ 4600 NMP/100 g de carne y líquido intravalvar) o reinstalación (recuentos de *E. coli* $>$ 46000 NMP/100 g de carne y líquido intravalvar) durante un período suficiente para cumplir con los criterios microbiológicos que se le exigen al producto final.

La depuración consiste en mantener a los bivalvos en tanques de agua de mar limpia, exenta de microorganismos, sustancias nocivas o plancton marino tóxico. El tiempo de depuración es variable, en función de la contaminación inicial de los bivalvos. Las condiciones de salinidad, oxigenación y temperatura del agua deben permitir maximizar la actividad natural de filtración de los bivalvos y reducir así su contaminación. Asimismo, este agua de mar limpia recircula a través de un sistema de depuración, sometiéndose a desinfección constante mediante la combinación de diversos métodos, como luz ultravioleta, ozono, cloración, yodación, electrolización, aireación, etc. De este modo, se garantiza el mantenimiento de la calidad microbiológica del agua de depuración durante todo el proceso. Por otro lado, en la reinstalación se produce una depuración natural de los moluscos bivalvos, trasladándose éstos a zonas marinas de baja contaminación durante un período mínimo de 2 meses [29].

La depuración y reinstalación son formas efectivas de reducir los niveles de bacterias fecales, como se ha demostrado en diversos estudios [29, 30, 32, 41], pero resultan menos útiles para eliminar otros contaminantes como los virus, los vibrios marinos

(*Vibrio parahaemolyticus* o *Vibrio vulnificus*), las biotoxinas marinas, los metales pesados o las sustancias químicas orgánicas [29, 39]. Por lo tanto, es necesario optimizar el diseño y funcionamiento de los sistemas de depuración para la eliminación de patógenos, y no orientarlos simplemente a la eliminación de indicadores bacterianos como *E. coli* [29]. Sin embargo, los criterios microbiológicos de seguridad alimentaria que se le exigen a los bivalvos para su comercialización, especificados en la legislación europea [5], sólo incluyen la ausencia de *Salmonella* spp. en 25 g de producto y unos recuentos máximos para *E. coli* de 230 NMP/100 g de carne y líquido intervalvar. Por esta razón, para evaluar la efectividad de los procesos de depuración, se utiliza *E. coli* como microorganismo indicador. Para ello se inocula al molusco una cantidad conocida de este microorganismo y se realizan recuentos periódicos a lo largo del proceso de depuración, validando así el tiempo necesario para la depuración del molusco, bajo unas condiciones dadas.

El uso de *E. coli* como indicador de contaminación fecal está muy extendido a nivel mundial y se lleva utilizando desde hace varias décadas [14, 18, 19]. Sin embargo, diversos autores proponen la utilización de otros microorganismos de origen entérico, como *Cl. perfringens*, como indicadores de contaminación fecal del agua de las zonas de extracción o producción de moluscos bivalvos [1, 18]. Así, Fujioka y Shizumura [15] sugieren que *Cl. perfringens* es mejor indicador que los coliformes o los enterococos, porque sus esporas son resistentes a las condiciones ambientales y sobreviven mucho más tiempo en el agua. Además, se trata de un microorganismo patógeno que se aísla frecuentemente en los moluscos bivalvos [35].

El objetivo de este estudio fue conocer la calidad microbiológica de mejillones del mediterráneo de diversos orígenes una vez depurados y evaluar el interés de utilizar como indicadores, a otros microorganismos como *Cl. perfringens*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Toma y procesamiento de las muestras

Se analizaron 45 muestras de *Mytilus galloprovincialis* pertenecientes a 15 lotes que procedían de diferentes zonas de producción de España (lotes del 1 al 12) e Italia (lotes 13, 14 y 15) (zonas de producción FAO 27, FAO 37.1 y FAO 37). Todas las muestras indicaban en su etiqueta que habían sido sometidas a un proceso de depuración. Cada muestra estaba formada por diez moluscos aproximadamente. La preparación de los moluscos para el análisis incluyó la limpieza de las valvas, remoción del contenido, mezclado de la carne y el líquido intervalvar y preparación de la dilución madre (90 mL de agua de peptona al 0,1 % + 10 g de carne y líquido intervalvar), todo ello en condiciones de esterilidad. Posteriormente, se homogenizaron mediante homogeneizador (Stomacher SPIN ST 500) y se realizaron las diluciones decimales correspondientes en agua de peptona al 0,1 %.

Análisis microbiológicos

En cada una de las muestras se realizó el recuento de microorganismos aerobios mesófilos, *Enterobacteriaceae*, *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio* spp. y *Cl. perfringens*, y el aislamiento e identificación de *Salmonella* spp., según la siguiente metodología:

- Para el recuento de microorganismos aerobios mesófilos se siguió la norma ISO 4833-1:2013 [26].
- El recuento de *Enterobacteriaceae* se realizó según la norma ISO 8523:1991 [20].
- Para el aislamiento y recuento de *E. coli* se siguió norma ISO 16649-2:2001 [21].
- El aislamiento y recuento de *L. monocytogenes* se efectuó según la norma ISO 11290-1:1996 [22].
- La investigación y recuento *Vibrio* spp. se realizó siguiendo la norma ISO 21872-1:2007 [23].
- Los recuentos de *Cl. perfringens* se efectuaron según la norma ISO 7937:2004 [24].

En todos los casos anteriores los resultados se expresan como log UFC /g de mejillón.

Por último, para el aislamiento e identificación de *Salmonella* spp. se analizaron las muestras según la norma ISO 6579:2002 [25]. Los resultados se expresaron como presencia o ausencia en 25 g de mejillón. El aislamiento de *Salmonella* en una de las tres muestras que componía cada lote se consideró como presencia en el lote.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la FIG. 1 se observan las prevalencias obtenidas para los distintos grupos bacterianos estudiados. Los microorganismos aerobios mesófilos y las enterobacterias presentaron las mayores prevalencias (100 y 86,6 % de los lotes, respectivamente). Se trata de dos grupos bacterianos que incluyen numerosas especies presentes en el agua donde crecen y se cosechan los mejillones [37], por lo que esta prevalencia es la esperable. Igualmente se obtuvo una prevalencia elevada para *Cl. perfringens* (86,6%). También se detectó la presencia de *Salmonella* spp. en varios de los lotes analizados, con una prevalencia del 26,6%, incumpliendo los criterios microbiológicos del Reglamento (CE) 2073/2005 [5].

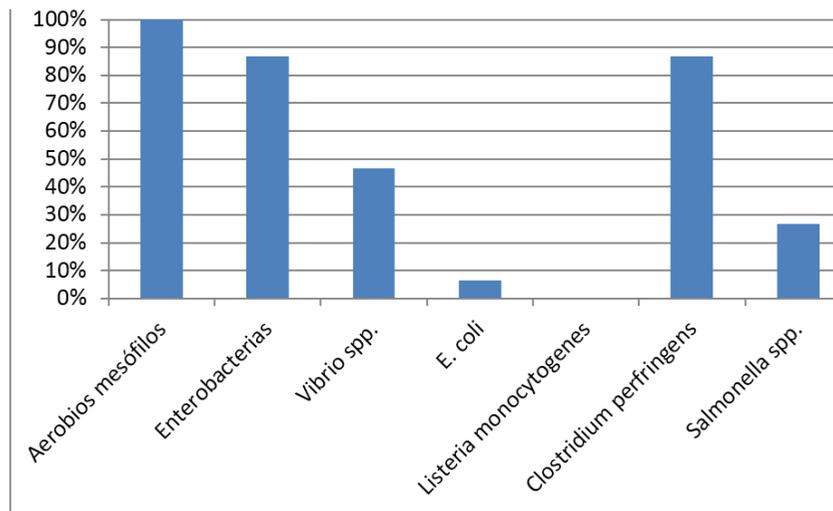


FIGURA 1. PREVALENCIA DE LOS MICROORGANISMOS AEROBIOS Mesófilos, Enterobacterias, Vibrio spp., E. coli, Listeria monocytogenes, Clostridium perfringens y Salmonella spp. EN LAS MUESTRAS DE MEJILLÓN ANALIZADAS.

Por el contrario, se observó una prevalencia moderada para *Vibrio* spp. (46,6%), una prevalencia baja para *E. coli* (6,66%) y la ausencia de *L. monocytogenes* en todas las muestras estudiadas.

En la TABLA I, se muestran las medias (n=3) de los recuentos obtenidos para cada grupo bacteriano y lote. Se puede observar que los recuentos más elevados correspondieron a los microorganismos aerobios mesófilos, con valores superiores a 3 log UFC/g en todos los lotes, destacando el lote 14 con

unos recuentos máximos de 4,72 log UFC/g. Estos niveles relativamente elevados de aerobios mesófilos son habituales en productos frescos aún no cocinados y no suelen suponer un peligro para el consumidor. En el caso de los mejillones, este grupo de microorganismos está constituido por la biota natural ambiental, que depende principalmente de la temperatura, la disponibilidad de oxígeno y la calidad del agua donde se desarrollan los moluscos [17]. En la Unión Europea, la normativa no exige el recuento de aerobios mesófilos en alimentos marinos.

TABLA I
**RECUENTOS OBTENIDOS DE LOS GRUPOS MICROBIANOS INVESTIGADOS (VALORES EXPRESADOS EN LOG UFC/G)
 E INCIDENCIA DE SALMONELLA (PRESENCIA/AUSENCIA EN 25 G) EN LOS DIFERENTES LOTES DE MEJILLONES
 ANALIZADOS**

| | Aerobios mesófilos | Enterobacterias | Vibrio spp | E. coli | Listeria monocytogenes | Clostridium perfringens | Salmonella spp |
|------|---------------------------|------------------------|-------------------|-------------------|-------------------------------|--------------------------------|-----------------------|
| Lote | \bar{x} n= 3 | \bar{x} n= 3 | \bar{x} n= 3 | \bar{x} n= 3 | \bar{x} n= 3 | \bar{x} n= 3 | n= 3 |
| 1 | 3,54 | <1 | <1 | <1 | <1 | 3,20 | Ausencia |
| 2 | 4,01 | 1,75 | <1 | <1 | <1 | 1,88 | Presencia |
| 3 | 3,70 | 2,62 | <1 | <1 | <1 | <1 | Ausencia |
| 4 | 3,30 | 1,82 | <1 | <1 | <1 | 1,00 | Ausencia |
| 5 | 3,51 | 2,49 | 1,00 | <1 | <1 | 1,74 | Ausencia |
| 6 | 4,44 | 1,00 | <1 | 1,00 | <1 | 2,14 | Ausencia |
| 7 | 3,43 | <1 | <1 | <1 | <1 | 1,18 | Ausencia |
| 8 | 3,64 | 1,18 | <1 | <1 | <1 | 1,00 | Ausencia |
| 9 | 3,89 | 2,47 | 2,20 | <1 | <1 | 1,82 | Ausencia |
| 10 | 4,63 | 2,27 | 2,11 | <1 | <1 | 3,00 | Ausencia |
| 11 | 4,10 | 3,09 | <1 | <1 | <1 | <1 | Ausencia |
| 12 | 3,86 | 1,74 | 2,55 | <1 | <1 | 1,43 | Ausencia |
| 13 | 4,31 | 3,19 | 2,10 | <1 | <1 | 1,60 | Presencia |
| 14 | 4,72 | 3,17 | 1,85 | <1 | <1 | 2,75 | Presencia |
| 15 | 3,62 | 3,28 | 1,30 | <1 | <1 | 1,37 | Presencia |

En el caso de las enterobacterias, los recuentos son variados pero no superan en ningún lote los 3,3 log ufc/g. El valor máximo se obtiene para el lote 15 en el que alcanzan los 3,28 log UFC/g. El nivel de enterobacterias en los alimentos se considera un indicador de la calidad sanitaria de los mismos y, aunque los recuentos obtenidos en las muestras analizadas en general no son demasiado elevados, hay que tener en cuenta que muchos microorganismos patógenos pertenecen a este género.

Por otra parte, se detectó la presencia de *Vibrio* spp. en siete de los lotes, con recuentos máximos de 2,55 log UFC/g en el lote 12. Estos resultados difieren de los obtenidos por Yilmaz y col. [44], que no detectaron este microorganismo en ninguna de las muestras de *Mytilus galloprovincialis* y *Chamelea gallina* analizadas, y de los obtenidos por Constanzo y col. [10], que sólo detectaron *Vibrio* spp. en una muestra de *Mytilus galloprovincialis*. Por el contrario, Manna y col. [33] encontraron una prevalencia del 100 % para *Vibrio* spp. en las muestras de mejillones analizadas. Estas diferencias en los resultados pueden deberse a las diferentes condiciones climáticas de las áreas de donde se extrajeron los bivalvos. Además, hay que tener en cuenta que en estos trabajos se analizaron bivalvos sin depurar, mientras que en el presente estudio se analizaron mejillones ya depurados, lo que llevaría a pensar que los recuentos obtenidos deberían haber sido inferiores. Sin embargo, según el estudio realizado por Croci y col. [11], el proceso de depuración consigue un menor efecto reductor en los recuentos

de *Vibrio* spp. (reducción de aproximadamente un logaritmo) que en los recuentos de *E. coli* (reducción de aproximadamente tres logaritmos). Así, estos autores concluyeron que *E. coli* no es un buen indicador en moluscos depurados.

Por otro lado, *E. coli* sólo se detectó en las tres muestras de uno de los lotes analizados (lote 6) pero ninguna superaba los límites establecidos en la legislación [5]. Estos resultados fueron los esperados, ya que varios estudios [3, 11] han demostrado la efectividad del proceso de depuración para eliminar a este microorganismo. En bivalvos sin depurar, Puente y col. [40] y Yilmaz y col. [44] obtuvieron una prevalencia de *E. coli* muy superior en almejas (63%) y en *Mytilus galloprovincialis* (100%). En cambio, los resultados de Martínez y Villalobos [34] son algo más parecidos a los del presente trabajo, puesto que obtuvieron un 15% de prevalencia en ostras sin depurar. En estos trabajos, y puesto que se trataba de bivalvos sin depurar, la presencia de *E. coli* en las muestras tenía una relación directa con la calidad del agua donde se extrajeron. *E. coli* se utiliza habitualmente como indicador sanitario de la calidad del agua, y en la Unión Europea, al igual que en otros países, las áreas de producción de los moluscos bivalvos se clasifican en función de los recuentos para este microorganismo [4].

En cuanto a *Cl. perfringens*, se detectó su presencia en trece de los quince lotes investigados, oscilando los recuentos entre 1,00 y 3,20 log UFC/g. Algunos autores atribuyen a *Cl. perfringens* una ventaja para su uso como indicador cuando se trata de calificar

agua altamente contaminada, por la facilidad y sensibilidad de la técnica utilizada habitualmente en su detección y recuento [16]. De hecho, si se comparan los recuentos de *E. coli* y *Cl. perfringens*, se puede observar que los niveles de este último son más elevados que los de *E. coli* en todas las muestras (TABLA I), a pesar de que ambos son microorganismos de origen entérico. Esto es debido a que *Cl. perfringens* por su carácter esporulado soporta mejor los hábitats extraintestinales que los coliformes. En otros estudios sobre bivalvos sin depurar se han encontrado prevalencias de *Cl. perfringens* variables. Así, Saito [42], en Japón, detectó este microorganismo en el 12% de las muestras de ostras analizadas; Villalobos y Elguezabal [43] obtuvieron una prevalencia del 37% de esta misma bacteria, en ostras de la zona oriente de Venezuela; Muñoz y col. [37] detectaron al microorganismo en el 60% de los bivalvos del género *Perna* analizados; y Burrow y col. [8] constataron una prevalencia del 56% en mejillones de la zona de Turquía. En mejillones depurados, Pasquale y col. [38] encontraron una prevalencia de *Clostridium difficile* de casi el 50%, lo que demuestra la resistencia del género *Clostridium* a los procesos de depuración. En el presente estudio, hay que tener en cuenta que muchos de los lotes procedían de la zona noroeste de España donde la pluviosidad es elevada, por lo que los nutrientes y la materia orgánica, aportados por la lluvia a los sistemas costeros y zonas de producción de los moluscos, son aprovechados por la comunidad bacteriana. Por esta razón, las bacterias sulfito reductoras suelen ser abundantes en estos medios marinos [31].

Hasta el momento, en la legislación europea no se ha incluido *Cl. perfringens* como criterio microbiológico, ni para evaluar la calidad sanitaria de las zonas de producción de moluscos bivalvos ni como criterio microbiológico aplicable a los productos alimentarios, ya sean moluscos bivalvos o cualquier otro tipo de alimento.

Sin embargo, *Cl. perfringens* se ha usado de manera satisfactoria como indicador de contaminación fecal de larga permanencia en sistemas acuáticos [12]. A su vez, ha mostrado correlación con la presencia de patógenos en estuarios [13] y ha mostrado ser el indicador de contaminación fecal ideal en condiciones en las cuales la supervivencia es crítica [6], debido a que su capacidad para formar esporas le confiere resistencia a elevadas temperaturas, desecación, niveles de pH extremos o falta de nutrientes, entre otras condiciones ambientales adversas [9].

Burkhardt y col. [7] estudiaron la acumulación de microorganismos indicadores en la almeja *Mercenaria mercenari*, obteniendo que las mayores tasas de acumulación correspondían a los bacteriófagos y a *Cl. perfringens*. Esto sugiere que la utilización de *Cl. perfringens* como indicador de contaminación fecal podría tener una ventaja con respecto a otros indicadores como *E. coli*. También Burkhardt y Calci [6] obtuvieron que la bioacumulación de *Cl. perfringens* en moluscos bivalvos no parece estar influenciada por las condiciones ambientales (como la temperatura o la salinidad), encontrando una tasa de acumulación de *Cl. perfringens* 245 veces más alta que la de los coliformes.

Así, llegaron a la conclusión de que *Cl. perfringens* puede servir como centinela para determinar si una zona de cosecha de moluscos bivalvos ha sido afectada por contaminación fecal.

En este sentido, tal y como se ha comentado con anterioridad, actualmente los centros de depuración de moluscos validan el proceso de depuración atendiendo a la eficacia del mismo en la reducción de la contaminación fecal de los bivalvos. Utilizan para ello un único microorganismo indicador, *E. coli*. Sin embargo, dada la elevada prevalencia de *Cl. perfringens* detectada en el presente estudio, parece adecuado considerar el uso de este microorganismo como criterio microbiológico en los moluscos bivalvos, ya que son excelentes indicadores de una contaminación fecal reciente o lejana en el tiempo y no son parte de la microbiota de los ambientes marinos [37]. Además, sería conveniente incluir *Cl. perfringens*, como indicador de la efectividad del proceso de depuración de los moluscos, empleándose como criterio microbiológico durante la validación del proceso.

Con respecto a la prevalencia de *Listeria* spp, no se detectó su presencia en ninguna de las muestras analizadas.

En cuanto a *Salmonella* spp., se detectó su presencia en diez muestras, pertenecientes a los lotes 2; 13; 14 y 15 (TABLA I), lo cual incumple el Reglamento Europeo (CE) 2073/2005 [5] que exige su ausencia en 25 g de cada muestra analizada. Hay que tener en cuenta además, que las temperaturas a las que habitualmente se cocinan los mejillones son relativamente bajas, por lo que no aseguran la destrucción de este importante patógeno. Esta prevalencia es superior a la obtenida por otros autores en bivalvos sin depurar. Así, Manna y col. [33], detectaron salmonella en el 15 % de las muestras de mejillones analizadas, Constanzo y col. [10], sólo encontraron una muestra de *Mytilus galloprovincialis* positiva a *Salmonella* spp. y Yilmaz y col. [44] no detectaron la presencia de *Salmonella* spp. en muestras de *Mytilus galloprovincialis* y *Chamelea gallina*. En este sentido, hay que indicar que Morrison y col. [36] demostraron que *Salmonella* era capaz de persistir en ostras sometidas a un proceso de depuración de tres días, mientras que los niveles de *E. coli* se veían reducidos en dos logaritmos. Este hecho, junto con los resultados de este trabajo, confirma que *E. coli* podría no ser el indicador más apropiado para los moluscos bivalvos.

CONCLUSIONES

La detección de *Salmonella* en algunas muestras y la casi constante presencia de *Cl. perfringens* en todas las muestras parece sugerir que, aunque el proceso de depuración reduce la presencia de *E. coli* hasta niveles inferiores a los límites establecido en la legislación, no es igual de efectivo para eliminar otros microorganismos patógenos como *Salmonella* y *Cl. perfringens*. Por otra parte, y a la vista de los resultados obtenidos, parece adecuado valorar el interés de *Cl. perfringens*, tanto a la hora de clasificar las diferentes zonas de producción de moluscos bivalvos (actualmente realizada únicamente en base a la concentración de *E. coli*), como en el control del proceso de

depuración y del producto final tras la misma, puesto que es un buen indicador de una contaminación fecal, reciente o lejana en el tiempo, y no forma parte de la microbiota natural de ambientes marinos. Finalmente los resultados evidencian la necesidad de realizar un cocinado adecuado de este alimento, por encima de los 65°C, que permita la destrucción de los microorganismos presentes, y no parece recomendable comer los mejillones crudos o poco cocinados.

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. Technol.** 20 (6-7): 63-70. 1988.
- [2] ADAMS, M.R.; MOSS, M.O. Microbiology of Primary Food Commodities. In: **Food Microbiology**. 3rd Ed. Royal Society of Chemistry Publishing, Cambridge, Pp 119-153. 2008.
- [3] ANACLETO, P.; MAULVAULT, A.L.; CHAGURI, M.; PEDRO, S.; NUNES, M.L.; ROSA, R.; MARQUES, A. Microbiological responses to depuration and transport of native and exotic clams at optimal and stressful temperatures. **Food Microbiol.** 36(2):365-73. 2013.
- [4] PARLAMENTO EUROPEO Y CONSEJO DE LA UNIÓN EUROPEA. Reglamento (CE) N° 854/2004, de 29 de abril de 2004 por el que se establecen normas específicas para la organización de controles oficiales de los productos de origen animal destinados al consumo humano. (DOUE N° 139, 30/4, Pp 206-324. 2004).
- [5] PARLAMENTO EUROPEO Y CONSEJO DE LA UNIÓN EUROPEA. Reglamento (CE) N° 2073/2005 de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. (DOUE N° 338, 22/12, Pp 1-25. 2005)
- [6] BURKHARDT, W.; CALCI, K. Selective accumulation may account for shellfish associated viral illness. **Appl. Environ. Microbiol.** 66(4): 1375-1378. 2000.
- [7] 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.
- [8] BURROW, H. *Clostridium perfringens* contamination of chilled sea fish and mussels in Turkey. **Arch. Lebensmittelhyg.** 25: 39-42. 1974.
- [9] 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. Pollut.** 109:137-146. 2000.
- [10] COSTANZO, N.; SARNO, E.; MAIONE, E.; SANTORO, A. Microbiological assessment of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) farmed and commercialized in campania region. **Ital. J. Food Saf.** 1(0): 209. 2011.
- [11] CROCI, L.; SUFFREDINI, E.; COZZI, L.; TOTI, L. Effects of depuration of molluscs experimentally contaminated with *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* O1 and *Vibrio parahaemolyticus*. **J. Appl. Microbiol.** 92:460-465. 2002.
- [12] 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, Antarctica. **Appl. Environ. Microbiol.** 64 (7): 2596-2600. 1998.
- [13] 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.
- [14] FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). 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., Pp 1-29. 1990.
- [15] FUJIOKA, R.S.; SHIZUMURA, L.K. *Clostridium perfringens*: A reliable indicator of stream water quality. **J. Water Pollut. Contr. Fed.** 57: 986-992. 1985.
- [16] GESCHE, E.; VALLEJOS, A.; SÁEZ, M. Eficiencia de anaerobios sulfito-reductores como indicadores de calidad sanitaria de agua, método del Número Más Probable (NMP). **Arch. Med. Vet.** 35: 99-107. 2003.
- [17] GONZÁLEZ, M.; VILLALOBOS, L.; VÁSQUEZ-SUÁREZ, A.; GRAÜ, C.; GIL, H. Enumeration of Mesophilic Aerobics, Faecal Coliforms and *Clostridium perfringens* in the Oyster *Crassostrea rhizophorae* from Laguna Grande del Obispo, Sucre State, Venezuela. **Rev. Cientif. FCV-LUZ.** XXI (1): 80-87. 2011.
- [18] GRIFFIN, D.W.; LIPP, E.K.; MCLAUGHLIN, M.R.; ROSE, J.B. Marine Recreation and Public Health Microbiology: Quest for the Ideal Indicator. **BioSci.** 51(10):817-825. 2001.
- [19] HERRERA, A.; SUAREZ, P. Indicadores bacterianos como herramientas para medir la calidad ambiental del agua costera. **Inter cien.** 30 (3):171-176. 2005.
- [20] INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Microbiology - General guidance for the detection of Enterobacteriaceae with pre-enrichment. ISO 8523:1991. International Organization for Standardization, Geneva. 1991.
- [21] INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of

- beta-glucuronidase-positive *Escherichia coli* - Part 2: Colony-count technique at 44 degrees C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronide. ISO 16649-2:2001. International Organization for Standardization, Geneva. 2001.
- [22] INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* - Part 1: Detection method. ISO 11290-1:1996. International Organization for Standardization, Geneva. 1996.
- [23] INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of potentially enteropathogenic *Vibrio* spp. - Part 1: Detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae*. ISO/TS 21872-1:2007. International Organization for Standardization, Geneva. 2007.
- [24] INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of *Clostridium perfringens* - Colony-count technique. ISO 7937:2004. International Organization for Standardization, Geneva. 2004.
- [25] INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. ISO 6579:2002. International Organization for Standardization, Geneva. 2002.
- [26] INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Microbiology of the food chain - Horizontal method for the enumeration of microorganisms - Part 1: Colony count at 30 degrees C by the pour plate technique. ISO 4833-1:2013. International Organization for Standardization, Geneva. 2013.
- [27] JAY, J.; LOESSENER, M.; GOLDEN D. Carnes y Pescados Procesados. En: **Microbiología Moderna de los Alimentos**. 5ª Ed. Editorial Acribia, S.A, Zaragoza, Pp 97-121. 2005.
- [28] LE VAY, L.L.; EGAN, E. Shellfish. En: Robinson, R. K., Batt, C. A. and Patel P. D. (Eds.). **Encyclopedia of Food Microbiology**. Academic Press, London, Pp 1993-2007. 2000.
- [29] LEE, R.; LOVATELLI, A.; ABABOUC, L. Depuración de bivalvos: aspectos fundamentales y prácticos. FAO Documento Técnico de Pesca. No. 511. Roma, FAO. Pp 5-20. 2010.
- [30] LEES, D.; YOUNGER, A.; DORE, B. Depuration and relaying. In: **WHO: Safe management of Shellfish and harvest waters**. IWA Publishing, London, UK, Pp 145-181. 2010.
- [31] LENGELER, J.W.; DREWS, G.; SCHLEGEL, H.G. Anaerobic Energy Metabolism. In: **Biology of the Prokaryotes**. Blackwell. Stuttgart, Alemania. Pp 278-324. 1999.
- [32] LÓPEZ, C.; DARRIBA, S.; MIRANDA, M.; ÁLVAREZ, C. Depuración de la navaja *Ensis arcuatus* (Jeffreys, 1865) y el longueirón *Ensis siliqua* (L., 1758) (Solenacea). **Bol. Inst. Esp. Oceanogr.** 21:311-315. 2005.
- [33] MANNA, H.; MIMOUNI, R.; CHAOUQY, N.; HAMADI, F.; MARTÍNEZ-URTAZA, J. Occurrence of *Vibrio* and *Salmonella* species in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) collected along the Moroccan Atlantic coast. **SpringerPlus.** 3:265. 2014.
- [34] MARTÍNEZ-NAZARET, R.E.; VILLALOBOS DE B., L.B. Enteropathogenic *Escherichia coli* in raw and cooked molluscs. **Rev. Cientif. FCV-LUZ.** II (2):163-167. 2005.
- [35] 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.
- [36] MORRISON, C.M.; ARMSTRONG, A.E.; EVANS, S.; MILD, R.M.; LANGDON, C.J.; JOENS, L.A. Survival of *Salmonella* Newport in oysters. **Int. J. Food Microbiol.** 1488 (2): 93-98. 2011.
- [37] MUÑOZ, D.; GRAÜ DE M., C.; VILLALOBOS DE B., L.B.; MARVAL, H.; MARTÍNEZ, C.; ZERPA, A. Use of *Clostridium perfringens* as an indicator of fecal pollution in areas of bivalve mollusks aquaculture in Sucre State, Venezuela. **Rev. Cientif. FCV-LUZ.** II (20): 575-583. 2010.
- [38] PASQUALE, V.; ROMANO, V.; RUPNIK, M.; CAPUANO, F.; BOVE, D.; ALIBERTI, F.; KROVACEK, K.; DUMONTET, S. Occurrence of toxigenic *Clostridium difficile* in edible bivalve molluscs. **J. Food Prot.** 72(7):1443-1449. 2009.
- [39] POLO, D.; ÁLVAREZ, C.; LONGA, Á.; ROMALDE, J.L. Effectiveness of depuration for hepatitis A virus removal from mussels (*Mytilus galloprovincialis*). **Int. J. Food. Microbiol.** 180:16-24. 2014.
- [40] PUENTE, A.; JUANES, 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. Oceanogr.** 18 (1-4): 67-73. 2002.
- [41] RICHARDS, G.P.; MACLEOD, C.; LE GUYADER, F.S. Processing Strategies to Inactivate Enteric Viruses in Shellfish. **Food Environ. Virol.** 2:183-193. 2010.

- [42] SAITO, M. Production of enterotoxin by *Clostridium perfringens* derived from humans, animals, foods and the natural environment in Japan. **J. Food Protect.** 53: 115-118. 1990.
- [43] VILLALOBOS, L.; ELGUEZÁBAL, L. Microbiological quality of the bivalve *Pinctada imbricata* commercialized in Cumaná, Venezuela. **Acta Cient. Venez.** 52 (1): 55-61. 2001.
- [44] YILMAZ, I.; BILGIN, B. Occurrence of *Vibrio* and other pathogenic bacteria in *Mytilus galloprovincialis* and *Venus gallina* harvested from the Marmara Sea. **Turk. J. Vet. Anim. Sci.** 29: 409-415. 2005.