



**UNIVERSIDAD DE PANAMÁ.**

**Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología.**

**Escuela de Biología**

DETERMINACIÓN DE LA CARGA MICROBIANA DE COLIFORMES Y *VIBRIO* SPP. EN BIVALVOS DE IMPORTANCIA COMERCIAL (*DONAX PUNCTATOSTRIATUS*, *LEUKOMA ASPÉRRIMA* Y *ANADARA TUBERCULOSA*) EN TRES ZONAS DE PRODUCCIÓN DE LA BAHÍA DE PANAMÁ DURANTE LA ESTACIÓN LLUVIOSA 2020.

Presentado Por:

Elicia Ayarza (8-884-1870)

Luis I. Camarena V. (8-913-1872)

Eva Y. Martínez F. (8-881-122)

Trabajo de graduación presentado a la Escuela de Biología como requisito parcial para optar por el título de Licenciado en Biología con Orientación en Microbiología y Parasitología.

Panamá, Rep. de Panamá

2022

# **DEDICATORIAS**

Dedico este trabajo primero y principalmente a Dios por haberme acompañado y guiado durante todo el camino de mi carrera, darme sabiduría. En segundo lugar, a mis padres por haberme ayudado a lograr mis metas, por los valores que me han inculcado y por haberme dado una excelente educación a lo largo de la vida para ser una gran profesional. Por último, agradezco a mi pareja Luis por estar conmigo apoyándome, dando el ánimo para poder terminar mi carrera. También, a mis compañeros de tesis, por el esfuerzo y superación mostrados, ante todas las adversidades que se presentaron en el camino hacia nuestro objetivo.

Elicia Ayarza

Este trabajo va dedicado a Dios y a mis padres que pese a la inflexión y retraso ocasionado por la pandemia y todos los contratiempos que surgieron debido a ella, tuvieron la paciencia para apoyarme económica y moralmente en todas las necesidades que se presentaron. En segundo lugar, estoy agradecido de haber realizado este proyecto junto a las mejores compañeras que pude haber tenido, fungiendo de soporte ante todas las adversidades que se nos presentaron.

Luis Isaac Camarena Vargas

Dedico de manera especial a Dios ya mis Padres por haberme ayudado en esta carrera universitaria, ellos forjaron los cimientos de mi vida profesional, sentaron las bases de responsabilidad y deseos de superación.

A mis Profesores de la universidad por el tiempo y esfuerzo que dedicaron a compartir sus conocimientos, sin su instrucción profesional no habría llegado a este nivel. A mis compañeros, ya que estuvimos uno para el otro con el deseo de salir adelante a pesar de las adversidades, siempre tuvimos la valentía de seguir y terminar la tesis en conjunto.

A Dios por darme vida, salud y sabiduría a lo largo del estudio de la licenciatura en Biología.

Eva Yaide Martínez Flores

# **AGRADECIMIENTO**

Primero le agradecemos a Dios por la sabiduría y fortaleza que nos dio para seguir adelante.

A los asesores Dr. Alex O. Martínez Torres, Mgter. Fermín Mejía y Mgter. Humberto Cornejo por facilitarnos las instalaciones de LAMEXA y LAMA. Además, por siempre estar presentes y anente a nuestro trabajo, el tiempo brindado durante el proyecto de tesis.

También, agradecemos a los estudiantes de maestría Asquena Aguilar y Wilmaira Palacio que nos ayudaron en el procesamiento de las muestras y nos aconsejaron en el transcurso de esta experiencia.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto: “Caracterización genética de virus, bacteriófagos, bacterias y parásitos en tres almejas contaminadas naturalmente en Panamá”, mediante el convenio N°041-53-2019 del fondo de agua, área protegida y vida silvestre del Ministerio de Ambiente.

Elicia, Luis y Eva

# ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIAS .....	III
AGRADECIMIENTO.....	IV
ÍNDICE GENERAL .....	VI
ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS .....	IX
ÍNDICE DE CUADROS.....	X
ÍNDICE DE FIGURAS .....	XI
RESUMEN .....	XIV
INTRODUCCIÓN .....	18
CAPÍTULO I .....	5
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
1.1 Generalidades de los moluscos.....	6
1.2 Biología de los bivalvos .....	6
1.3 Especies a estudiar.....	7
1.3.1 <i>Anadara tuberculosa</i> .....	7
1.3.2 <i>Donax punctatostriatus</i> .....	8
1.3.3 <i>Leukoma aspérrima</i> .....	8
1.4 Problemas que afectan a la inocuidad de los moluscos bivalvos .....	9
1.4.1 Fuentes de contaminación.....	9
1.5 Enfermedades transmitidas por los moluscos bivalvos.....	11
1.6 Límites legales de la norma de la Unión Europea Aplicado a la producción y comercialización de moluscos bivalvos.....	12
1.7 Microorganismos indicadores encontrados en los moluscos bivalvos .....	14
1.7.1 coliformes totales.....	14
1.7.2 coliformes termotolerantes (anteriormente conocidas como fecales) .	15
1.7.3. <i>Escherichia coli</i> .....	15
1.8 Otros microorganismos de importancia alimentaria presente en los bivalvo.	16
1.8.1 <i>Vibrio</i> spp.....	16
1.8.1.1 <i>V. cholerae</i> .....	16
1.8.1.2 <i>V. parahaemolyticus</i> .....	17
1.8.1.3 <i>V. vulnificus</i> .....	18
1.9. Epidemiología y patogenicidad .....	18
OBJETIVOS .....	20
Objetivo general:.....	20
Objetivos específicos: .....	20
HIPOTESIS .....	21
CAPÍTULO II .....	22
MATERIALES Y MÉTODOS .....	22

2.1 MATERIALES .....	23
2.1.1 Equipos de laboratorio .....	23
2.1.2 Cristalería .....	23
2.1.3 Medios de cultivo y Reactivos .....	23
2.1.4 Otros materiales .....	23
2.2 METODOLOGIA .....	24
2.2.1 Descripción del área de estudio .....	24
2.2.1.1 Zona de Producción de Bique .....	25
2.2.1.2 Zona de producción de Chame .....	25
2.2.1.3 Zona de producción de Chepo .....	26
2.2.2 Recolección de las muestras.....	27
2.2.3 Procesamiento de las muestras .....	27
2.2.4 Análisis microbiológico .....	28
2.2.4.1 Prueba presuntiva .....	28
2.2.4.2 coliformes termotolerantes .....	29
2.2.4.3 <i>E. coli</i> .....	29
2.2.4.4 Aislamiento de <i>Vibrio</i> spp.....	29
2.2.5. Análisis estadístico .....	31
CAPÍTULO III .....	32
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
3.1 RESULTADOS .....	33
3.1.1 Meses de muestreo .....	36
3.2 DISCUSIÓN.....	39
CAPÍTULO IV .....	48
4.1 CONCLUSIONES .....	49
4.2 RECOMENDACIONES.....	50
BIBLIOGRAFÍA .....	51
ANEXOS .....	62



# **ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS**

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Ubicación y coordenadas de las estaciones de muestreo.....	62
<b>Cuadro 2.</b> Dimensión de <i>Anadara tuberculosa</i> .....	62
<b>Cuadro 3.</b> Dimensiones de <i>Leukoma aspérrima</i> .....	62
<b>Cuadro 4.</b> Dimensiones de <i>Donax punctatostriatus</i> .....	63
<b>Cuadro 5.</b> Categoría de la zona de producción, según la densidad de indicadores microbiológicos por especies de almejas.....	63
<b>Cuadro 6.</b> Categoría de la zona de producción, según la densidad microbiológica a lo largo de los meses de muestreo.....	64

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Vista satelital de la zona de producción de Chame.....	64
<b>Figura 2.</b> Vista satelital de la zona de producción de Bique.....	65
<b>Figura 3.</b> Vista satelital de la zona de producción de Chepo.....	65
<b>Figura 4.</b> Mapa de la zona de producción de Playa Bique, El Espavé y Playa Chinina.....	66
<b>Figura 5.</b> Especies de bivalvos colectadas.....	66
<b>Figura 6.</b> Lavado superficial de las especies de bivalvos y extracción del cuerpo y líquido intervalvar de las tres especies de bivalvos.....	67
<b>Figura 7.</b> Licuado del líquido intervalvar con buffer de fosfato y pesaje de la muestra.....	67
<b>Figura 8.</b> Dilución seriada para la muestra y prueba presuntiva que dieron positivas a 37°C durante 48 h.....	68
<b>Figura 9.</b> Traslado de los tubos positivos al medio EC-MUG y Prueba realizada para determinar las muestras positivas de coliforme termotolerantes y <i>E. coli</i> al exponer a la luz ultravioleta (fluorescencia).....	68
<b>Figura 10.</b> Dilución seriada para <i>Vibrio</i> spp. y técnica de estriación de los tubos positivos .....	69
<b>Figura 11.</b> Prueba confirmativa de <i>Vibrio</i> spp. por medio TCBS y se considera positivo aquellos platos que dieron color violeta con la prueba de catalasa.....	69
<b>Figura 12.</b> Prueba confirmativa, para la colonia de <i>Vibrio</i> spp. con el medio Hardy Chrome.....	70
<b>Figura 13.</b> Diagrama de cajas de los microorganismos: coliformes totales (CT), coliformes termotolerantes (CTT) y <i>E. coli</i> (EC) por NMP/g, en los sitios Bique, Chame y Chepo durante la estación lluviosa.....	70
<b>Figura 14.</b> Diagrama de caja con relación a los meses de muestreo para coliformes termotolerantes.....	71
<b>Figura 15.</b> Diagrama de caja con relación a los meses de muestreo para <i>E. coli</i> .....	71
<b>Figura 16.</b> Porcentaje de positividad en la zona de producción de Chame.....	72

<b>Figura 17.</b> Porcentaje de positividad en la zona de producción de Bique.....	72
<b>Figura 18.</b> Porcentaje de positividad en la zona de producción de Chepo.....	73

# RESUMEN

The bivalves *Anadara tuberculosa*, *Leukoma asperrima* and *Donax punctatostriatus* are widely consumed species in the Republic of Panama; however, the feeding mechanism and the lack of control measures make them vulnerable to the accumulation of biological and chemical contaminants inside. For this reason, the Bique, Chame and Chepo production areas were selected to determine the microbial load, using indicators such as thermotolerant coliforms and *E. coli*. In addition, the bacteria *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* and *V. cholerae* were identified. A total of 45 samples were collected, in the months of September, October and November 2020. The samples were transported in a cold chain to the Laboratory of Water Microbiology and Experimental Microbiology of the University of Panama. The bivalves, after being washed and processed in a sterile manner in a Laminar Flow Chamber, were weighed up to the sum of 100g of body and interval liquid, which were processed with 100 mL of phosphate buffer and then, serial dilutions of base 10 were made until  $10^6$ . The data obtained in this study were compared with the standard established by the European Union for the quality of Molluscs-Bivalves, taking as reference the most probable number (MPN) of thermotolerant coliforms and *E. coli* using the multiple tube method. The data obtained for the different zones indicated that Chepo and Bique had, from the thermotolerant coliform subdivision, 790 MPN/100g and 1893 MPN/100g respectively, both classified in category B, preceded by Chame, whose final value was 163 MPN/ 100g, placing it in category A. On the other hand, Chame had 60 MPN/100g and Chepo 83 MPN/100g of *E. coli*, placing it in category A, and Bique had 697 MPN/100 placing it in category B. As for the months sampled, October had 1763 MPN/100g and November 840 MPN/100g, so they are located in category A and September had 243 MPN/100g, placing them in category B. The results obtained in relation to *E. coli*, in the month of September had 53 MPN/100g and November 103 MPN/100g, assigned to category A, unlike October with 683 MPN/100g assigned to category B. Regarding *Vibrio spp.*, the microbiological procedure corresponding to the selective medium and differential, showed a higher prevalence of the species *V. parahaemolyticus* in the three production areas, followed by *V. vulnificus* and *V. cholera* with lower prevalence. In conclusion, the

production areas are exposed to contaminants that increase the bacterial load both as indicators of fecal contamination of pathogenic strains and *Vibrio* spp., putting the health of people who consume raw or lightly cooked products extracted from these production areas.

**Keywords:** *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae*, *V. vulnificus*, *E. coli*, thermotolerant coliforms, *D. punctatostriatus*, *L. asperrima*, *A. tuberculosa*, bivalves.

Los bivalvos *Anadara tuberculosa*, *Leukoma asperrima* y *Donax punctatostratus*, son especies de amplio consumo en la República de Panamá, sin embargo, el mecanismo de alimentación y la falta de medidas de control, los hacen vulnerables a acumular en su interior, contaminantes biológicos y químicos. Es por ello, que las zonas de producción de Bique, Chame y Chepo fueron seleccionadas para determinar la carga microbiana, mediante indicadores como coliformes termotolerantes y *E. coli*. Además, se identificaron las bacterias *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* y *V. cholerae*. Se colectaron 45 muestra en total en la época lluviosa de 2020, en los meses de septiembre, octubre y noviembre. Las muestras fueron transportadas en cadena de frío al Laboratorio de Microbiología de aguas y Microbiología Experimental de la Universidad de Panamá. Los bivalvos después de ser lavados y procesados de manera estéril en una Cámara de Flujo Laminar, se pesaron hasta la suma de 100 g de cuerpo y líquido intervalar que se procesaron con 100 mL de buffer fosfato y luego, se hicieron diluciones seriadas de base 10 hasta 10<sup>6</sup>. Los datos obtenidos en este estudio fueron comparados con la norma establecidas por la Unión Europea para la calidad de Moluscos-Bivalvos, tomando como referencia el número más probable (NMP) de coliformes termotolerantes y *E. coli* mediante el método de tubo múltiples. Los datos obtenidos para las diferentes zonas indicaron que Chepo y Bique tuvieron, de la subdivisión coliformes termotolerantes, 790 NMP/100g y 1893 NMP/100g respectivamente, ambas clasificadas en la categoría B, precedido de Chame, cuyo valor final fue de 163 NMP/100g, ubicándose en la categoría A. Por otra parte, Chame tuvo 60 NMP/100g y Chepo 83 NMP/100g de *E. coli*, ubicándose en la categoría A y Bique tuvo 697 NMP/100g ubicándose en la categoría B. En cuanto a los meses muestreados, octubre tuvo 1763 NMP/100g y noviembre 840 NMP/100g por lo que se ubican en la categoría A y septiembre con 243 NMP/100g ubicándose en la categoría B. Los resultados obtenidos con relación a *E. coli*, en el mes de septiembre fueron, 53 NMP/100g y noviembre 103 NMP/100g, asignados en la categoría A, a diferencia de octubre con 683 NMP/100g asignado en la categoría B. Con respecto a *Vibrio* spp., el procedimiento microbiológico correspondiente al medio selectivo y diferencial demostró una mayor prevalencia



de la especie *V. parahaemolyticus* en las tres zonas de producción, seguido de *V. vulnificus* y *V. cholerae* en menor prevalencia. En conclusión, las zonas de producción se encuentran expuestas a contaminantes que elevan la carga bacteriana tanto de indicadores de contaminación fecal de cepas patógenas como los *Vibrio* spp., poniendo en riesgo la salud de las personas que consumen crudos o ligeramente cocidos los productos extraídos de estas zonas de producción.

**Palabras claves:** *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae*, *V. vulnificus*, *E. coli*, coliformes termotolerantes, bivalvos.

# **INTRODUCCIÓN**

Las zonas costeras tienen una gran importancia como hábitat para muchas especies, que están expuestas a una gama de cambios en los parámetros físicos como la salinidad, temperatura, el aumento y decrecimiento de la marea, influyendo considerablemente en ellos. Estudios realizados por Escobar (2002), indican que la contaminación en el mar, proveniente de actividades antropogénicas y que este es el principal factor responsable (alrededor del 70 al 75%) de los cambios de las características propias de las zonas costeras. El principal problema de la contaminación en el ecosistema estuarino y su indudable influencia en la salud del medio costero se encuentra estrechamente relacionado con el incremento de las poblaciones mismas que habitan en estas zonas costeras, al igual que sucede con el aumento de actividades agrícolas e industriales, y esto se debe al escaso control de desechos líquidos y sólidos (González y González, 2015). La materia orgánica que llega al medio acuático suele poseer una contaminación elevada que procede de efluentes urbanos, industriales, agrícolas o ganaderos, que se liberan al medio con una elevada contaminación, tanto biológica como química (Elika, 2012). De hecho, el 90% de los contaminantes es transportado desde los ríos hasta el mar (Escobar, 2002). Atendiendo a estas consideraciones, las especies de bivalvos, por su alta capacidad de filtración, pueden llegar a acumular agentes patógenos cuando las aguas donde se desarrollan están contaminadas, causando la proliferación de enfermedades en los consumidores (Flores, 2018).

La contaminación por material fecal es uno de los motivos principales de contaminación en los estuarios y sigue siendo un grave peligro para la población y el ambiente, encontrándose asociado al uso del agua e incremento de microorganismos patógenos generados por personas y animales infectados. Es por ello, que el control sanitario se convierte en una medida básica para el control y mantenimiento adecuado con respecto a la salud de la población (Streitenberger y Baldini, 2016).

En las zonas cercanas a la costa, se desarrolla una actividad muy propia de los lugareños, se trata de la venta y distribución de bivalvos para el consumo de los habitantes de la zona, puesto que es considerado un alimento exquisito, los

vendedores realizan varias pescas con el fin de recibir una bonificación monetaria al venderlos. En consecuencia, la ingesta de bivalvos altamente contaminada puede perjudicar la salud del consumidor, debido a la falta de inocuidad de estos. Se debe tener presente que los bivalvos son organismos altamente filtradores, y al estar en contacto con coliformes totales y *E. coli* que se encuentra en el sedimento y agua, ocasiona la acumulación de estas bacterias en su sistema digestivo. Los análisis microbiológicos contribuyen a la implementación de medidas para controlar y preservar la salud humana y del ecosistema (Hidalgo Villón, 2019).

El grupo bacteriano coliformes representa a los bioindicadores de contaminación orgánica mejor caracterizados, e incluyen a las coliformes totales y a las coliformes termotolerantes (anteriormente conocidas como fecales). Estas últimas corresponden a bacterias que provienen exclusivamente del tracto intestinal del hombre y animales de sangre caliente, y por esto, se ha documentado que en el agua de mar la sobrevivencia de las enterobacterias es precaria y con tendencia a desaparecer totalmente, pero en presencia de materia orgánica finamente particulada, pueden experimentar multiplicación (Figuroa, 2008).

Por otra parte, los *Vibrio* spp. son microorganismos halófilos que se halla comúnmente en ambientes marinos y estuarios (Kriem *et al.*, 2015), género que comprende diferentes especies, considerándose estas tres como las patógenas de mayor importancia para el ser humano: *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* (FDA, 2017).

La identificación de esta bacteria en productos hidrobiológicos es relevante ya que estos pueden actuar como vehículo de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) asociados al consumo de mariscos, tales como infecciones del tracto gastrointestinal que, en un intervalo corto de tiempo, como de 24 h post ingestión, puede causar diarrea, náusea, vómito, fiebre y dolor estomacal (CDC, 2017).

Según el Ministerio de Salud (MINSa), en Panamá no hay registro específico que señale intoxicación alimentaria por moluscos bivalvos. Existen informes epidemiológicos de pacientes afectados con intoxicación alimentaria, pero no se especifica que alimento es el causante de la intoxicación (Pierson y Smoot, 2001).

A pesar de esto, una de las enfermedades que puede transmitirse al hombre a

través del consumo de los bivalvos o la toma de agua poco apta para el consumo, es el

cólera, el cual es una enfermedad reemergente puesto que el único reporte en Panamá se presentó entre 1991-1993 (MINSA, 2013).

Con el interés de determinar la calidad microbiológica de tres zonas de producción de bivalvos en Panamá, se planteó el objetivo de determinar la carga microbiana de coliformes y *Vibrio* spp. en las especies *Donax punctatostriatus*, *Leukoma aspérrima* y *Anadara tuberculosa*, provenientes de sus zonas de producción.

# **CAPÍTULO I**

## **REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **1.1 Generalidades de los moluscos**

Los moluscos constituyen el segundo phylum animal más numeroso en el planeta (Darrigran y Damborenea, 2017) y son uno de los grupos de invertebrados marinos más abundantes. De los cuales, con pocas excepciones, solo se encuentran en un determinado continente, ya que algunos géneros desaparecieron. A razón de su habitad, están ampliamente distribuidos en todo tipo de ambientes (González-Solís *et al.*, 2018), son un componente importante de las comunidades bentónicas en zonas costeras (Campos y Díaz, 2007). Presentan una morfología muy heterogénea, desde típicas formas de almejas, ostras, caracoles, babosas, quitones y lapas hasta organismos con tamaños y formas considerables como los pulpos y calamares (Bermúdez, 2015).

Son organismos filtradores, capaces de concentrar en sus tejidos distintos contaminantes del ambiente que los rodea debido al proceso de bioacumulación (Zuykovet *et al.*, 2013). Durante la marea alta utilizando los sifones, los cuales extienden a la superficie de la tierra para coleccionar organismos microscópicos y partículas de la columna de agua. De esta manera las partículas de arena, junto con otras partículas indeseadas como los virus, bacterias y otros contaminantes (poluentes), quedan atrapadas en sus órganos, tales como las agallas, intestino y músculos aductores, convirtiéndose en un riesgo para la salud (Montiel *et al.*, 2011).

### **1.2 Biología de los bivalvos**

El grupo bivalvo está constituido por una clase de moluscos que se caracteriza por la compresión lateral de su cuerpo protegido por una concha bivalva (Alcántar, 2015). Estas valvas que constituyen una sola pieza son el resultado de la adaptación morfológica efectuada durante la historia filogenética de la clase Bivalvia donde, a partir de la forma ancestral, la modificación básica involucra una compresión lateral y elongación dorso-ventral (Castilla, 2007).

Estas especies cuentan con sifones (almejas), el pie se encuentra en posición anterior ventral y los sifones en la zona posterior (Helm, 2006). De este modo, la mayoría de ellos filtran el agua e ingieren algas unicelulares, protozoos y

partículas orgánicas de variados orígenes. Por eso, los moluscos bivalvos tienden a concentrar ciertos tipos de bacterias, causando enfermedades al organismo y muchas veces, a las personas que las ingieren (Cumbicos y Ruiz, 2017).

### **1.3 Especies a estudiar**

#### **1.3.1 *Anadara tuberculosa***

El molusco bivalvo (*A. tuberculosa*), cuyo nombre común es “concha prieta o negra”, Clase Bivalvia, Subclase Pteriomorphia, Orden Arcoida, Superfamilia Arcacea, Familia Arcidae y Género *Anadara* (Gray, 1847), es una de las numerosas especies que sustenta el humedal manglar localizado en la zona marina-costera del Pacífico americano. Se caracteriza por tener valvas de color blanco, revestido por un perióstraco grueso y arrugado que varía de color desde tonos cafés hasta negros (Sowerby y Jimenez, 1994). La concha es equivalva, inequilatera, ovalada y gruesa; su longitud es de 30 a 70 mm, con diámetro de 27 a 48 mm, posee de 33 a 37 costillas radiales que están redondeadas y relativamente juntas el cual presenta nódulos o tubérculos sobre el margen anterior; el margen dorsal es angulado en ambos extremos. El perióstraco a menudo es erosionado en los umbos de modo que deja descubierta a la concha, su charnela es recta, delgada y larga; los bordes internos presentan crenulaciones resistentes que son parte de las costillas externas, la cavidad umbonal posee un color purpura claro (Keen, 1971).

Este molusco habita en las raíces del mangle rojo, *Rhizophora mangle* Linnaeus, en la zona intermareal donde recibe aportes salinos de agua continental, la influencia directa de las mareas y corrientes marinas, con suelos mayoritariamente fangosos. (Lazarich-Gener, 2009). Su presencia se ha reportado desde el norte de Perú (Punta Telégrafo), hasta el sur de México (Laguna San Ignacio, Baja California Sur), incluyendo Ecuador, Colombia, Panamá, Nicaragua, Costa Rica, Guatemala, El Salvador, Honduras y México (Paredes *et al.*, 2016)



### **1.3.2 *Donax punctatostratus***

Las especies del género *Donax*, *Bivalvia*: *Donacidae* habitan comúnmente en la zona intermareal y de barrido del oleaje de muchas playas arenosas con alta energía de áreas tropicales de las Antillas y en los países circuncaribeños. Estos organismos migran sincrónicamente con las mareas, manteniendo un patrón de zonación que logran por medio de transporte pasivo ascendente y descendente, utilizando los sifones y el pie en los procesos de detenerse y enterrarse en la zona intermareal. Las poblaciones de este molusco en el Caribe varían anualmente en densidad, tamaño y color de la concha. Los factores que influyen en esta distribución son principalmente el tamaño y ordenamiento del grano de arena, el declive de la playa, el grado de exposición a las olas y el contenido orgánico de la arena (WADE, 1969).

Esta especie es filtradora suspensívora y sus poblaciones, como en otros Donácidos, son temporalmente abundantes y son excelentes enterradores adaptados a la zona de rompientes de las playas (Gaspar *et al.*, 1999; Herrmann *et al.*, 2009).

### **1.3.3 *Leukoma aspérrima***

Conocida como almeja blanca (*Leukoma aspérrima* anteriormente conocida como *Protothaca aspérrima*), de la familia *Verenidae*, es un bivalvo propio del océano Pacífico que soporta una explotación intensiva por parte de los habitantes de playa Bique en Arraiján (López *et al.*, 2005). Presentan el cuerpo robusto y comprimido lateralmente, encerrados por valvas subovaladas que se articulan sobre un ligamento flexible, contiene costillas radiales pequeñas que se cruzan como hilos concéntricos dando un aspecto enrejado y rugoso. Charnela generalmente con 3 dientes cardinales en cada valva, su coloración varía de blanco tiza a grisáceo, este presenta manchas café oscuras. La talla es de 6 cm de longitud máxima total (Delgado y García, 2010).

Se encuentran inmersos en zonas estuarinas, que esta compuestas por canales de marea y playones, sin embargo, algunas de estas especies pueden estar en

áreas alejadas a los manglares como zonas lodosas, barreras arenosas y zonas rocosas de las desembocaduras de los estuarios (Ortiz, 2018).

Algunas zonas donde se pueden encontrar esta especie en Panamá: Puerto Caimito, Bique, Punta Chame, en la provincia de Panamá; Garachiné y Taimití en Darién, y Farallón en Coclé. En los dos primeros lugares se extrae este molusco; sin embargo, es Bique en donde esta actividad es mayor, sufriendo los requerimientos de este bivalvo en la ciudad de Panamá (López *et al.*, 2005)

#### **1.4 Problemas que afectan a la inocuidad de los moluscos bivalvos**

La inocuidad en moluscos bivalvos, se define como la característica que estos deben poseer de estar libres de cualquier material extraño que represente un peligro para la salud humana, asociado a su consumo (SENASICA, 2003).

Algunos problemas que pueden comprometer la inocuidad de estos bivalvos, son generados por la contaminación industrial, actividades agrícolas, asentamientos, actividades humanas, ríos, fenómenos naturales, falta de instalaciones alejadas y a la carencia de programas eficientes de higiene del personal. Así mismo, por un uso inadecuado de medicamentos veterinarios y sustancias químicas, que son utilizados por algunos productores como una forma de reducir la probabilidad de aparición de enfermedades en los organismos cultivados (SENASICA, 2003).

##### **1.4.1 Fuentes de contaminación**

Según los programas sanitarios de moluscos bivalvos consultados (NSSP-FDA, 2009, PMSMB, 2012), las fuentes de contaminación se clasifican en: puntuales, cuando en el área de cosecha existe una descarga de contaminantes y no puntuales si la descarga de contaminantes afecta sólo los alrededores del área. Por otra parte, también es importante distinguir la clase de impacto contaminante tomando en cuenta su temporalidad: sería actual cuando la fuente de contaminación esté presente durante la evaluación de la misma y afecte la calidad sanitaria del agua, o potencial, cuando la fuente de contaminación, a pesar de estar presente durante la evaluación del área, sólo afecte en ocasiones excepcionales la calidad sanitaria del agua (Iriarte, 2015).

El origen de la contaminación en áreas de crecimiento y cosecha de moluscos bivalvos, es atribuido a diversos factores:

Los provenientes de asentamientos humanos (poblaciones y/o rancherías pesqueras), marinas y/o muelles, entran dentro de la categoría de contaminación antropogénica. Constan de aguas residuales (aguas crudas y/o tratadas de tipo doméstico, municipal, industrial, agrícola o pecuario) y se clasifican como descargas de aguas negras, grises, tratadas, etc. Igualmente lo son los residuos sólidos (también de origen doméstico, municipal y/o industrial) y los provenientes de letrinas y fosas sépticas (NSSP-FDA, 2009; PMSMB, 2012).

Las fuentes de contaminación pueden ser también naturales, como las hidrológicas, ríos y arroyos tanto permanentes como temporales que vierten al cuerpo de agua donde crecen y se cosechan los moluscos bivalvos, así como las derivadas de fenómenos naturales eventos de marea roja, huracanes, tormentas tropicales, inundaciones y otros que ocurren durante el período de tiempo que abarca el estudio sanitario, tanto en el área de interés como en sus alrededores y los efectos que pudieron provocar (PMSMB, 2008; NSSP-FDA, 2009).

Los provenientes de la fauna silvestre y doméstica, así como su temporalidad residentes o migratorias y las poblaciones de otros tipos de animales silvestres que pudieran impactar en la calidad del agua o de los moluscos bivalvos (PMSMB, 2008; NSSP-FDA, 2009).

Por otra parte, la contaminación puede estar asociada con una condición estacional o meteorológica. Por ejemplo, las áreas de moluscos cerca de centros urbanos suelen ser más susceptibles a la contaminación durante la época de lluvias, debido a las aguas de escurrimiento contaminadas y desbordamiento de plantas de tratamiento y/o pozos sépticos. También hay que tomar en cuenta a las descargas de aguas servidas por la borda desde barcos fondeados en embarcaderos, pues podrían contaminar las aguas cercanas de la zona de crecimiento de moluscos (Furfari, 1991).

## 1.5 Enfermedades transmitidas por los moluscos bivalvos

Los moluscos bivalvos pueden filtrar hasta 50 L de agua por día, concentrando por bacterias, virus y residuos químicos en sus tejidos (Sandoval y Sanborío, 2008). Los bivalvos concentran los contaminantes que se hallan en la columna de agua donde crecen. Los que hace un peligro para la salud pública que provocan enfermedades a las personas que los ingieren, debido al consumo crudos (como las ostras) o pocos cocidos (como los mejillones) (Lee *et al.*, 2010).

La calidad microbiológica de los bivalvos es un reflejo del sitio donde los mismos se desarrollan (Narváez, 2003). Así, en ambientes contaminados por descargas fecales, la acumulación de microorganismos patógenos es un hecho resultante (Kay *et al.*, 2008). Varios factores contribuyen al papel de los moluscos bivalvos como vehículos transmisores de enfermedades causadas por bacterias y virus: primero, los moluscos bivalvos son capturados principalmente de estuarios y ambientes cercanos a las costas, y estas áreas están generalmente contaminadas, en varios grados, con descargas humanas; segundo, los humanos generalmente consumen el molusco entero, incluyendo el tracto gastrointestinal del molusco, en donde los patógenos se concentran y mantienen viables, con capacidad para llegar al tracto gastrointestinal de los humanos, pudiendo producir enfermedades (Martínez, 1992).

Entre los microorganismos asociados a enfermedades de origen alimentario, a través de moluscos bivalvos, se encuentran: *Salmonella typhi*, *S. paratyphi*, *Shigella*, *Vibrio*, *Campylobacter jejuni*, *Pleisomonas shigelloides* y *Aeromona shydrophila*. Los coliformes termotolerantes, *E. coli* y enterococos han sido ampliamente utilizados como indicadores de patógenos fecales en la carne de los moluscos bivalvos y agua, respectivamente (Grabow *et al.*, 1992; Anderson *et al.*, 2005).

## **1.6 Límites legales de la norma de la Unión Europea Aplicado a la producción y comercialización de moluscos bivalvos.**

La legislación comunitaria establece, de forma general, que no se deben comercializar alimentos que no sean seguros. De forma más específica establece límites máximos de varios contaminantes (SERNAPESCA, 2018).

**Tipo A:** Para consumo humano directo. Los recursos extraídos desde estas zonas pueden ser exportados en estado vivo, fresco refrigerado o procesado. Los moluscos obtenidos en dichas zonas deberán cumplir las siguientes condiciones:

1. Poseer las características visuales propias de la frescura y la viabilidad, incluida la ausencia de suciedad en la concha, una reacción a la percusión adecuada y una cantidad normal de líquido intervalvar.
2. Tendrán un máximo de 230 NMP de *E. coli* /100 g de carne de molusco y líquido intervalvar, considerando 5 tubos y 3 diluciones
3. No contendrán *Salmonella* en 25 g de carne de molusco.
4. No contendrán *V. parahaemolyticus* en 15 g de carne de molusco.
5. En el caso de ostras, no contendrán Norovirus en 15 g de hepatopáncreas.
6. No contendrán compuestos tóxicos, ni nocivos de origen natural o introducidos en el medio ambiente en cantidades tales que la absorción alimentaria calculada supere la ingesta diaria admisible (IDA) para el hombre o que pueda deteriorar el sabor del producto.
7. La cantidad de veneno paralítico del molusco, VMP, en las partes comestibles (el cuerpo entero o toda la parte consumible separada) no deberá sobrepasar los 80 µg por 100 g, según el método de análisis biológico, al que puede asociarse un método químico de detección de saxitoxina o cualquier otro método reconocido por la Unión Europea (EU)
8. El nivel máximo total de ácido okadaico, dinofisistoxinas y pectenotoxinas en moluscos bivalvos, equinodermos y tunicados (el cuerpo entero o cualquier parte comestible por separado) será de 160 µg de equivalentes de ácido okadaico/kg, de acuerdo con el método biológico o con métodos de detección alternativos.

9. El nivel máximo de exotoxinas en moluscos bivalvos, tunicados y equinodermos (el cuerpo entero o cualquier parte comestible por separado) será de 3.75 mg de esa toxina/kg, de acuerdo con el método biológico o con métodos de detección alternativos.

10. El nivel máximo de azaspirácidos en moluscos bivalvos, tunicados y equinodermos (el cuerpo entero o cualquier parte comestible por separado) será de 160 µg de equivalentes de azaspirácido/kg, de acuerdo con el método biológico o con métodos de detección alternativos.

11. El porcentaje de veneno amnésico del molusco, VAM, en las partes comestibles (el cuerpo entero o cualquier parte comestible por separado) no deberá sobrepasar los 20 µg de ácido domoico por gramo, según el procedimiento de análisis HPLC.

12. A falta de métodos habituales de detección de virus y de normas virológicas, el control sanitario se basará en el recuento de bacterias indicadoras de contaminación fecal.

**Tipo B:** Para depuración, reinstalación o aplicación de tratamientos térmicos aprobados.

1. Los moluscos bivalvos obtenidos de dichas zonas deben presentar, en el 90% de los resultados, un índice no superior a 4 600 NMP de *E. coli*/100 g de carne y líquido intervalvar en el que se utilicen 5 tubos y 3 diluciones. El 10% restante no podrá ser superior a 46 000 NMP de *E. coli*/100 g de carne y líquido intervalvar.

2. Los moluscos bivalvos podrán someterse, previo a su consumo, a un tratamiento en un centro de depuración o reinstalación en una zona autorizada. Luego de su depuración o reinstalación deberá cumplir todas las exigencias fijadas para zona Tipo A.

3. Los moluscos bivalvos podrán someterse, previo a su consumo, a un tratamiento en un centro de depuración o reinstalación en una zona autorizada. Luego de su depuración o reinstalación deberá cumplir todas las exigencias fijadas para zona Tipo A.

**Tipo C:** Para reinstalación por períodos largos de tiempo o aplicación de tratamientos térmicos aprobados.

1. Los moluscos bivalvos vivos procedentes de estas zonas deben presentar un índice no superior a 46 000 NMP de *E. coli*/100 g de carne y líquido intervalvar, en el que se utilicen 5 tubos y 3 diluciones.
2. Los moluscos bivalvos sólo podrán destinarse a consumo humano luego de someterse a un tratamiento en una zona de reinstalación durante un periodo largo de tiempo no inferior a dos meses.
3. Los moluscos bivalvos podrán someterse, previo a su consumo, a alguno de los procesos establecidos por la Unión Europea.

## **1.7 Microorganismos indicadores encontrados en los moluscos bivalvos**

### **1.7.1 Coliformes totales**

Los coliformes totales son microorganismos indicadores de la familia *Enterobacteriaceae*, que pueden ser de origen ambiental y fecal, provenientes de animales de sangre caliente (OPS, 2016). Son bacilos cortos, Gram negativos, anaerobios facultativos, no esporulados, que fermentan la lactosa a 35°C, en menos de 48 h, con producción de ácido y gas.

Durante mucho tiempo se consideraron evidencia de contaminación fecal, pero se ha demostrado que mucho de ellos puede vivir e incluso crecer en el suelo, el agua y otros ambientes. Actualmente, se consideran un excelente indicador de la eficiencia de los procesos de sanitización y desinfección, así como de calidad sanitaria en agua, vegetales y diversos productos procesados (Pierson y Smoot, 2001). Los microorganismos que conforman el grupo de los coliformes totales son: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Edwardsiella* y *Citrobacter*, viven como saprofitos independientes o como bacterias intestinales; los coliformes fecales son de origen intestinal (Pullido *et al.*,2005).

### **1.7.2 Coliformes termotolerantes (anteriormente conocidas como fecales)**

Las bacterias coliformes termotolerantes forman parte del total del grupo coliformes. Son definidas como bacilos Gramnegativos, no esporulados que fermentan la lactosa con producción de ácido y gas (CEPIS,2011). Pero se diferencian de estos últimos, en que son indol positivo, su intervalo de temperatura óptima de crecimiento es muy amplio hasta 45°C(Prada y Ponte, 2019).

En el grupo de bacterias termotolerantes está incluida la *E. coli*, considerada como un organismo indicador de contaminación fecal. Se ha demostrado que esta bacteria siempre está presente en un número elevado en las heces de humanos y animales de sangre caliente y comprende casi 95% de los coliformes en las heces (Delgado, 2015).

Este grupo particular que puede estar presente en el ambiente que rodea a los moluscos bivalvos. La utilización de estos microorganismos como indicadores de calidad microbiológica, ha sido una práctica establecida desde hace muchos años (Mossel y Moreno, 1985).

### **1.7.3 *E. coli***

La *E. coli* es una bacteria Gram negativa, anaerobia facultativa, que es parte de la microbiota residente en humanos y animales de sangre caliente. Esta bacteria es utilizada como el principal indicador de contaminación fecal, cuando se evalúa la inocuidad de los alimentos y el agua (FAO, 2011).

Entre los hábitats en los cuales la *E. coli* se adapta incluyen agua, sedimentos, suelo y alimentos, pero algunas de estas cepas de *E. coli* han evolucionado y se han adaptado a un estilo de vida patógeno y pueden causar diferentes enfermedades patológicas (Leimbachet *al.*, 2013).

La presencia de *E. coli* puede ser indicativo de contaminación en compañía de otras bacterias, virus o protozoarios, pudiendo generar enfermedades. Al igual que la *Salmonella*, que es una bacteria comúnmente presente en alimentos y agua contaminada. Una persona puede experimentar por lo general: malestar, vómitos,



infecciones intestinales, fiebre y diarrea (College of Agriculture and Life Sciences, 2014).

## **1.8 Otros microorganismos de importancia alimentaria presente en los bivalvos**

### **1.8.1 *Vibrio* spp.**

El género *Vibrio* spp. son bacterias Gram negativas, no entéricas, fermentadoras, con forma recta o curvada, anaerobias facultativas, catalasas positivas y móviles por un flagelo polar, fermentan glucosa con producción de ácido y oxidasa positivo en la mayoría de las especies (Koneman, 2006).

Son habituales en ambientes marinos, aunque, pueden estar presentes en agua dulce, así como el tracto digestivo de personas y animales. Generalmente los animales suelen adquirir este microorganismo a través de alimentos contaminados o heridas (Vadillo *et al.*, 2003).

Las diferentes especies involucradas en la infección al ser humano pueden generar enfermedades tanto intestinales como extraintestinales (Mortajemi y Adams, 2006), considerándose tres especies de mayor reporte en afectar al ser humano que son *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* (CDC, 2017).

#### **1.8.1.1 *V. cholerae***

*V. cholerae* es un bacilo Gram negativo, móvil, flagelado que no forma esporas, que sobrevive en medios alcalinos a temperaturas entre 22 y 40°C. La infección por *Vibrio* spp. no es invasiva, quedan en el tubo intestinal donde se adhieren a receptores celulares específicos presentes en las vellosidades de las células epiteliales del mismo (ANMAT, 2011).

Se conocen más de 200 serogrupos de *V. cholerae* clasificados de acuerdo con su antígeno somático termoestable "o".<sup>1</sup> El *V. cholerae* 01 aglutina con el suero monoespecífico 0:1, los serogrupos restantes se conocen como no 01, a excepción del serotipo 0139 identificado en Bangladesh en 1992 y confinado al área sudoriental. Este último junto con el 01 son los únicos que causan brotes epidémicos. Generalmente los serogrupos no-01/no-139 se pueden encontrar en

fuentes ambientales y se asocian como causantes de gastroenteritis o de infecciones extraintestinales. *V. cholerae* 01 se ha considerado como el serogrupo virulento y epidémico por excelencia. La reciente 0139 surge de la seroconversión de 01El Tor debido al intercambio horizontal de material genético, lo cual determina la biosíntesis de antígeno O (Guerrero *et al.*, 2022)

Es considerado un agente etiológico que se encuentra en aguas salobres o marinas, cuyas variaciones climáticas locales de temperatura o aumento en la población del plancton pueden favorecer su proliferación (Ghose, 2011).

Estas bacterias provocan consecuencias clínicas a nivel internacional al consumir productos marinos contaminados por este patógeno. Los síntomas que manifiesta el paciente van desde gastroenteritis, infección de la piel, septicemia, llegando a la mortalidad en el caso de pacientes inmunocomprometidos (Rowe-Magnus *et al.*, 2006).

#### **1.8.1.2. *V. parahaemolyticus***

*V. parahaemolyticus* es un bacilo halófilo marino el cual habita las costas y estuarios de múltiples países (Nair *et al.*, 2007). Tiene un tiempo de generación a 37°C de 8 a 9 min, de tal modo que puede alcanzar concentraciones muy altas en poco tiempo, ya que la bacteria puede crecer después de la recolección de los mariscos si la temperatura es la adecuada para este crecimiento (Hernández *et al.*, 2005).

Presenta varios serotipos, que se diferencian según sus antígenos somático (O), capsular (K) y flagelar (H). El sistema más extendido de serotipado se realiza en base a la variabilidad en los antígenos O y K. Así, se han descrito 13 variantes de antígenos O y 71 de antígenos K, de forma que la determinación de serotipos por combinación O: K ha resultado de gran utilidad para el estudio epidemiológico de la enfermedad causada por este patógeno. Sin embargo, la cepa *V. parahaemolyticus* O3:K6 aislada por primera vez en Calcuta (India), es una de las más virulentas llegando a diseminarse rápidamente a otros lugares y aumentando la incidencia de esta enfermedad (Yeung *et al.*, 2002).

Esta especie es causante de gastroenteritis aguda en el hombre, relacionada con el consumo de mariscos crudos, insuficientemente cocinados o contaminados

durante su preparación (Daniels *et al.*, 2000). Este microorganismo fue aislado e identificado por primera vez en el continente asiático, en Japón en el año 1953. Desde entonces ha sido reportado en otros países dentro del continente (Parthasarathy *et al.*, 2016) y posteriormente en Europa y América (Velázquez *et al.*, 2014).

#### **1.8.1.3 *V. vulnificus***

Es una bacteria Gram negativa que crece a una temperatura aproximada de 20°C y salinidad de 0.7 y 1.6 g/L. Se encuentra en las ostras, almejas y mariscos de aguas costeras o en las desembocaduras de ríos de todo el mundo. Este microorganismo también está presente en el sedimento, plancton y otras formas de vida marina; ha sido aislado de una gran variedad de ecosistemas tales como las costas del Golfo de México, océano Atlántico y el océano Pacífico.

No hay evidencia de transmisión del *V. vulnificus* de persona a persona y no está relacionado con la contaminación fecal. Las personas que tienen condiciones inmunocomprometidas y especialmente aquellas con enfermedades crónicas del hígado, están particularmente en riesgo de contraer una infección por *V. vulnificus* cuando comen pescado y mariscos crudos o poco cocidos, o si se bañan en aguas marinas con una cortada o rasguño (Zúñiga y Caro, 2014).

### **1.9. Epidemiología y patogenicidad**

De acuerdo con la OMS, en 2017, 34 países reportaron un total de 1 227 391 casos de cólera y 5 654 defunciones, con una tasa de letalidad de 0.5%. En el continente asiático ocurrió el 84% y en África el 14% de todos los casos de cólera a nivel mundial, y en las Américas, Haití reportó 13 681 casos (1%) (Waldman *et al.*, 2013). La mayor parte de los casos corresponde a países en vías de desarrollo, lo que significa un problema sanitario y/o de infraestructura (acceso a agua segura), condicionantes para brotes y epidemias. (DGESSM, 2018).

En México, con información de la Secretaría de Salud, en el año 2017 no se reportó ningún caso de cólera, sin embargo, en 2018 se notificó un caso en un

adulto (Nelson *et al.*, 2016). Por otra parte, la letalidad por cólera actualmente no debe ser mayor al 1% en el país.

Las personas con heridas abiertas en su gran mayoría están expuestas al *V. vulnificus* a través del contacto con aguas marinas, mariscos y fauna silvestre marina. Aun no se encuentra evidencia de la transmisión de persona a persona y no está relacionado con la contaminación fecal (Renato *et al.*, 2014).

La mayoría de las enfermedades por *V. vulnificus* tienen su brote en la temporada de verano. La temperatura, el pH, la salinidad y el componente orgánico entre otras son los responsables de que el número se acreciente en los productos marinos (Mira y García, 1997).

El primer caso de infección sistémica se dio en 1970 en un paciente que presentó infección en la herida de una de sus extremidades con gangrena, seguida de una amputación y posteriormente choque séptico, este paciente estuvo expuesto a las aguas de las costas en Nueva Inglaterra. La mayoría de los casos de *V. vulnificus* se han reportado en ostras que habitan en el Golfo de México, Costas del Pacífico y del Atlántico (Marisol *et al.*, 2013).

## OBJETIVOS

### Objetivo general:

Determinar la carga microbiana de coliformes, *E. coli* y Vibrios en la especie *Donax punctatostriatus*, *Leukoma asperrima* y *Anadara tuberculosa* en la Bahía de Panamá durante la estación lluviosa.

### Objetivos específicos:

- Cuantificar coliformes mediante número más probable en caldo Lauril Sulfato.
- Identificar bacterias termotolerantes mediante la utilización de caldo EC-MUG y presencia de gas en la capsula de Durham.
- Identificar bacterias *E. coli* por medio de la prueba de fluorescencia.
- Identificar los diferentes aislamientos mediante pruebas bioquímicas y así detectar las especies de *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae*, *V. vulnificus*.

Clasificar las zonas de producción en base a la Norma técnica de la Unión Europea.

## **HIPOTESIS**

Ha: El análisis microbiológico en bivalvos confirma la presencia de *Vibrios* y coliformes durante la estación lluviosa.

Ho: El análisis microbiológico en bivalvos no confirma la presencia de *Vibrios* y coliformes durante la estación lluviosa.

# **CAPÍTULO II**

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

## **2.1 MATERIALES**

### **2.1.1 Equipos de laboratorio**

Balanza analítica (METTLER AE200,Switzerland)), Balanza analítica (Denver Modelo 4101,Colorado, EEUU), Micropipetas (Finnpipette Digital 40-200  $\mu$ L,EEUU), Micropipetas (Eppendorf 1000  $\mu$ L, España), Cámara de flujo laminar (LABCONCO Modelo 4101,EEUU), Incubadora (LAB-LINE 120 y Thermolyne 142300,EEUU), Licuadora (Hamilton Beach modelo 909,EEUU), Refrigeradora (BIO SAMSUNG modelo SR-38 NMB,México), Balanza semi analítica (METTLER P163,Suiza), Lámpara de luz ultravioleta (UV), Asa bacteriológica, Autoclave (Yamato SM200, Japón).

### **2.1.2 Cristalería**

Probetas o cilindros graduados de 50 mL, probetas o cilindros graduados de 1000 mL, Pipetas de 5mL, pipetas de 10 mL, vasos químicos de vidrio de 100 mL, vasos químicos de vidrio de 600 mL, tubos de ensayo con rosca de 5 mL, tubos de ensayo con rosca de 20 mL, tubos Durham, Erlenmeyer de 250 mL, platos Petri de 100 x 15 mm, pipetas estériles de 1 mL, tubos de ensayo con rosca de 10 mL, micropipetas de 40-200  $\mu$ L, micropipetas de 1000 $\mu$ L.

### **2.1.3 Medios de cultivo y Reactivos**

Caldo Lauryl sulfato, caldo EC-MUG, caldo EC, Agar TBCS, agua peptonada alcalina, caldo nutritivo, NaCl (Cloruro de Sodio), potasio dihidrógeno fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), hidróxido de sodio (NaOH), sustrato específico colilert, sulfato de magnesio heptahidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), Peptona, Agar- agar, Hardy Chrome, Agar TSA, Indol fenol Oxidasa.

### **2.1.4 Otros materiales**

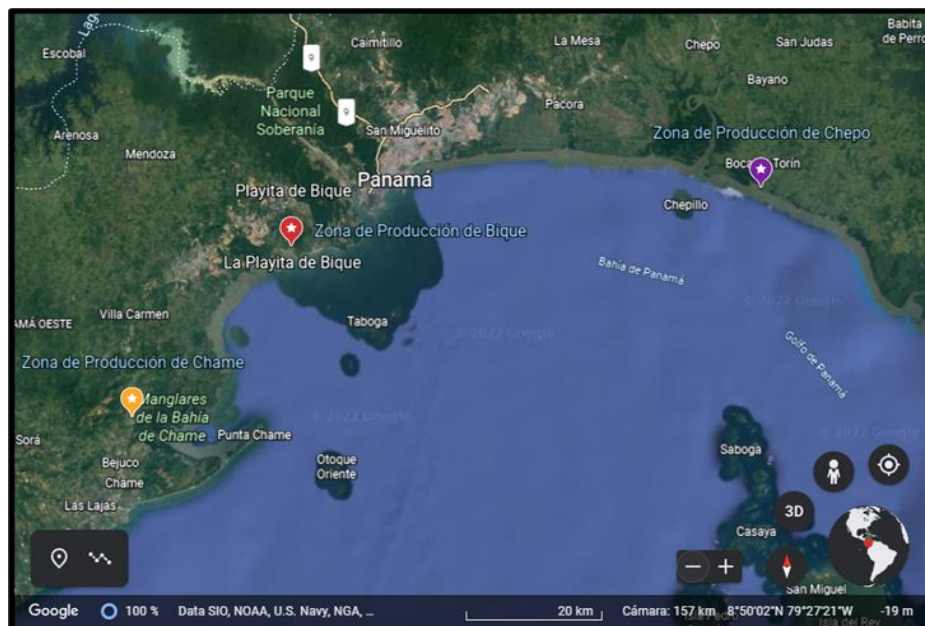
Guantes de látex desechables, jabón antibacterial, papel toalla, papel de aluminio, bolsas Ziploc, alcohol 70%, clorox, marcadores, fósforos, bolsas plásticas de basura, cepillos, masking tape, frasco de mayonesa, botellas para las diluciones, gradilla para tubos Eppendor, gradilla para tubos de ensayo (madera), navaja, espátula, lysol.



## 2.2 METODOLOGIA

### 2.2.1 Descripción del área de estudio

Para efectos del muestreo, se estableció tres áreas de colecta directamente de las zonas de producción: *D. punctatostriacus* en Chinina, Playa de Chepo, Este de la Provincia de Panamá; *L. asperrima* en Playa de Bique, Arraiján, Provincia de Panamá Oeste y *A. tuberculosa* en Sajalices, Chame, Provincia de Panamá Oeste.



**Figura1.** Mapa de la zona de producción Playita Bique, El Esparvé y Playa Chinina.

Ubicación	Coordenada
Zona 1. Bique	8°52'35" N 79° 39'38" O
Zona 2. Chame	8°38'00.0" N 79° 47'00.0" O
Zona 3. Chepo	8°58'59.88" N 79° 1'59.88" O

**Cuadro 1.** Ubicaciones y Coordenadas de las zonas de muestra

### 2.2.1.1 Zona de Producción de Bique

Esta zona de producción se encuentra en la Provincia de Panamá Oeste, distrito de Arraiján, a unos 30 Km de la Ciudad de Panamá ( $8^{\circ}52'35''$  N  $79^{\circ} 39'38''$  O). La zona está caracterizada por un litoral areno-fangoso. El área posee una pendiente ligera con una separación de las líneas de bajamar y pleamar de aproximadamente 1 Km y más. Sus orillas están pobladas por mangles de las especies *Rhizophora mangle* y *Avicennia nítida* (Smithsonian, 2013).

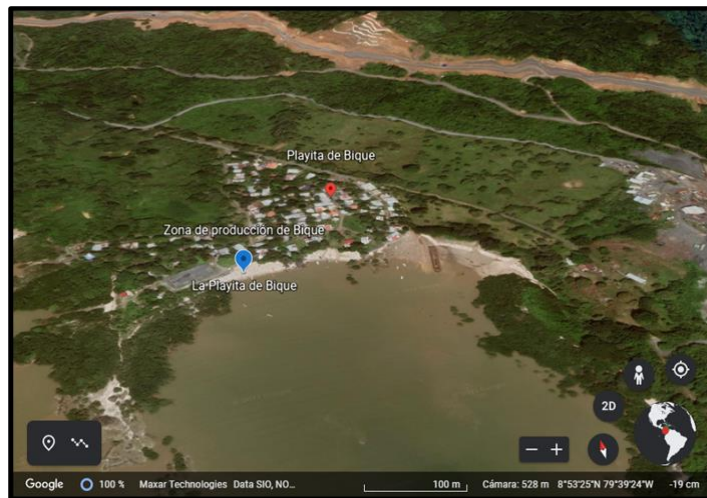
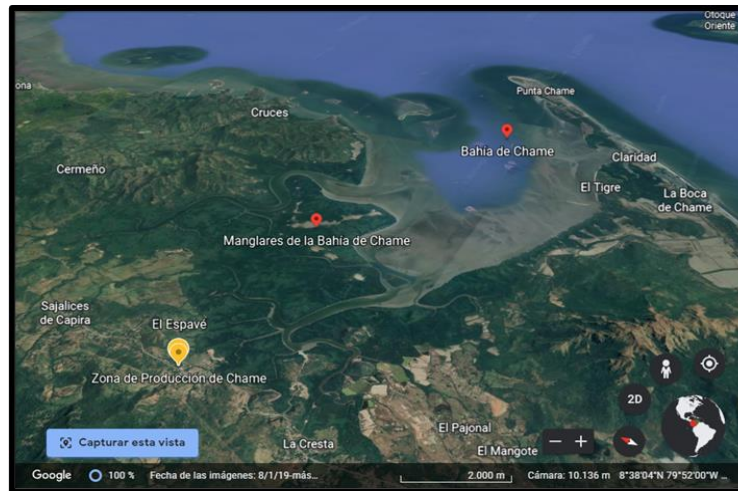


Figura 2. Vista satelital de la zona producción de Bique

### 2.2.1.2 Zona de producción de Chame

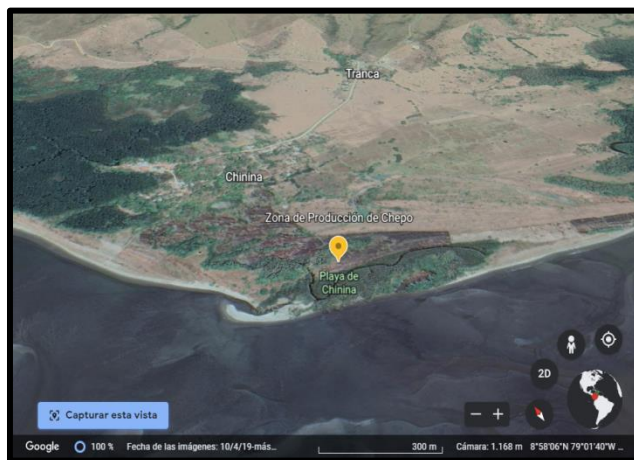
Se encuentra ubicado en la parte occidental de la provincia de Panamá, en la cordillera central en la vertiente del Pacífico, a unos 65 km de la ciudad de Panamá ( $8^{\circ}38'00.0''$  N  $79^{\circ} 47'00.0''$  O) (Ecu Red, 2010). Esta zona limita al norte con la estribación oriental de la cordillera central, Cerro Campana y Cerro Trinidad, al sur con la bahía de Chame, al Este con el corregimiento de Cermeño y Campana, y al oeste con el distrito de San Carlos. La cobertura del manglar está compuesta por varias especies. La especie dominante es esta zona es *R. mangle* y *R. racemos* (Bardiales, 2009)



**Figura 3.** Vista satelital de la zona producción de chame

### 2.2.1.3 Zona de producción de Chepo

Se encuentra en la provincia de Panamá, distrito de Chepo, es el puerto más importante del Este de Panamá, y está a solo 40 min desde Tocumen ( $8^{\circ}58'59.88''$  N  $79^{\circ} 1'59.88''$  O). Este se localiza en la desembocadura del río Bayano, aguas abajo de la represa. El mismo es utilizado por las personas para trasladarse hacia las comunidades de El Llano, Santa Cruz de Chinina, Chimán, Brujas, Chepillo y el Archipiélago de las Perlas. La inolvidable travesía, se hace en las pintorescas piraguas. El puerto de Coquira constituye un importante punto de comercio de pescado y mariscos para los chepanos y capitalinos, que se trasladan hasta este lugar con la finalidad de conseguir moluscos para su consumo y comercialización en la Ciudad de Panamá y en el extranjero (Guerrero, 2010)



**Figura 4.** Vista satelital de la zona producción de Cheme.

### 2.2.2 Recolección de las muestras

La colecta de muestras se realizó en las tres zonas de producción (Chame, Bique y Chepo), durante las mareas bajas de los meses de septiembre, octubre y noviembre. En cada mes se tomaron 5 muestras compuestas de bivalvos, reuniendo un total de 45 muestras en los tres meses de muestreo. Cada una consistió en un peso de 3 lb aproximadamente, las cuales fueron transportadas en cadena de frío y procesadas de inmediato en los Laboratorios de Microbiología Experimental y Aplicada (LAMEXA) y Microbiología de Aguas (LAMA), Vicerrectoría de Investigación y Post-Grado, Universidad de Panamá.

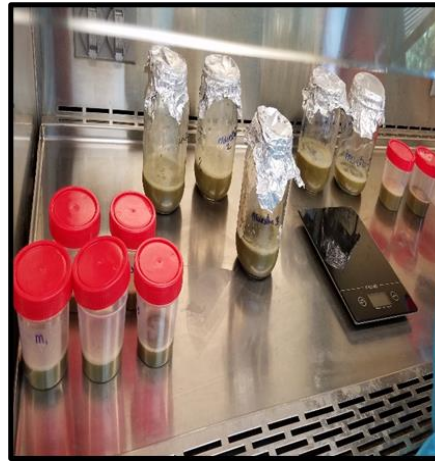
### 2.2.3 Procesamiento de las muestras

Las almejas de cada muestra fueron lavadas superficialmente para luego abrirlas y extraerles el cuerpo y el líquido intervalvar en una Cámara de flujo Laminar tipo II, para mantener la asepsia de las muestras. Este paso se hizo hasta completar 100 g de la muestra. Los 100 g de la muestra se homogenizaron con 100 mL del tampón de fosfato  $H_2PO_4^-$  [ $KH_2PO_4$  (1.25 mL) y sulfato de magnesio heptahidratado  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (5 mL) previamente esterilizado (Canadian Shellfish Sanitation Program, 2010). Luego, del homogenizado se tomaron 10 g y se le agregaron 90 mL de tampón para obtener una dilución  $10^{-1}$ , y de la dilución  $10^{-1}$  se tomaron 10 mL y se agregaron a 90 mL de buffer para obtener una dilución  $10^{-2}$  (Canadian Food Inspection Agency, 2005; Feng *et al.*, 2002). A cada muestra contenida de tejido y líquido intervalvar, se le aplicaron diluciones seriadas de  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$  y se procesaron mediante la técnica de tubos múltiples (Eaton *et al.*, 2005).



**Figura 6.** Lavado superficial, extracción del cuerpo y líquido intervalvar de las tres especies de bivalvos.



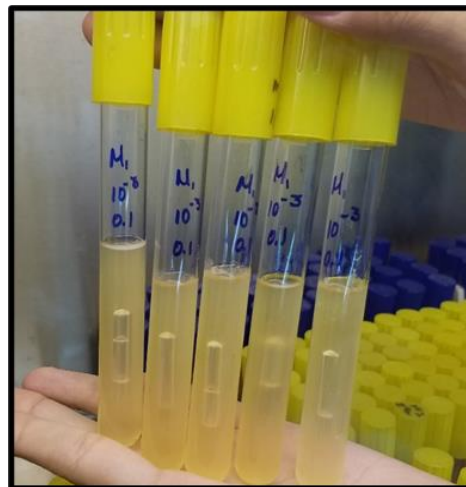
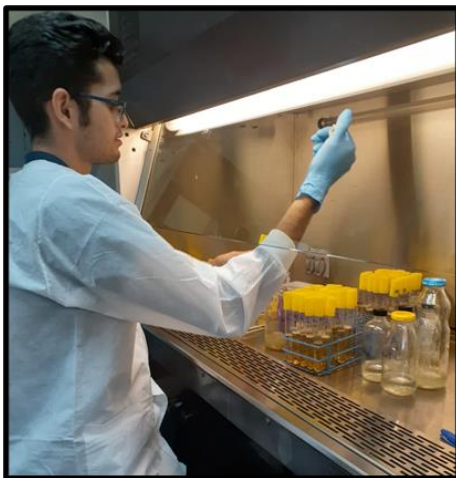


**Figura 7.** Licuado del líquido intervalvar con tampón fosfato y pesaje de la muestra.

## 2.2.4 Análisis microbiológico

### 2.2.4.1 Prueba presuntiva

Las diluciones de las muestras se sembraron en los tubos de caldo Lauril Triptosa empleando la Técnica de Tubos Múltiples para determinar bacterias fermentadoras de lactosa. Los tubos se incubaron a 37°C durante 48 h, aproximadamente. Todo tubo que presentó crecimiento y gas en la cápsula de Durham se considera como positivo. (Mclandsborough, 2005; American Public Health Association, 2005).



**Figura 8.** Dilución seriada para la muestra y prueba presuntiva que dieron positivo durante 48 h en la incubadora a 37°C.

#### 2.2.4.2 Coliformes termotolerantes

Los tubos positivos de la prueba con caldo Lauril Triptosa se pasaron a tubos con medio de EC-MUG (medio para coliformes termotolerantes y *E. coli*). Se incubaron a 44°C durante 24 a 48 h. Los tubos con crecimiento y gas en la cápsula de Durham se consideraron positivos para coliformes termotolerantes.



**Figura 9.** Traslado de los tubos positivos al medio EC-MUG. Prueba realizada para determinar las muestras positivas de Coliforme termotolerantes y *E. coli* al exponer a la luz ultravioleta (fluorescencia).

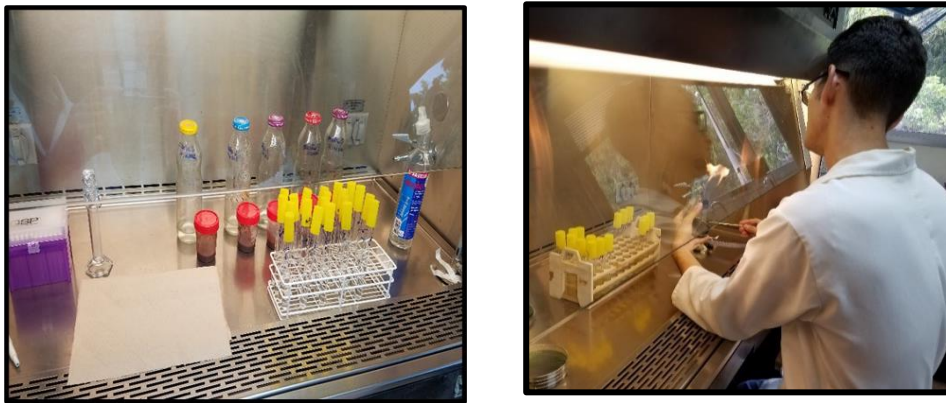
#### 2.2.4.3 *E. coli*

Los tubos positivos para Coliformes termotolerantes que presentaron fluorescencia al ser expuestos a luz ultravioleta se consideraron positivos para *E. coli* (McLandsborough, 2005). Finalmente, se anotó la combinación de los tubos positivos EC-MUG y se determinó el número más probable (NMP) de *E. coli* por cada gramo de muestra (Canadian shellfishsanitationprogram, 2002).

#### 2.2.4.4 Aislamiento de *Vibrio* spp.

A partir del licuado se tomaron 5 g de la muestra y se añadieron 45 mL de solución de cloruro de sodio (NaCl) al 2% (p/v) en un recipiente estéril y se mezclaron durante 2 min agitando ligeramente. Mediante la implementación de diluciones seriadas se diluyeron las muestras desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-4}$  utilizando NaCl al 2% (p/v) (1 mL de muestra y 9 mL de NaCl). Posteriormente, se inoculó 1 mL de cada

dilución a 10 ml de agua peptonada alcalina (APW). Los tubos se incubaron a 37°C durante 16 a 18 h, aproximadamente. Después, se verificó la turbidez de los tubos. Aquellos que presentaban turbidez se consideraron positivos. Es importante no agitar los tubos durante el proceso para evitar la aireación, ya que esto puede alterar los resultados. Luego, se inocularon las muestras en agar tiosulfato citrato bilis (TCBS) y se incubaron a 37°C durante 16 a 18 h. Las Unidades Formadoras de Colonia (UFC) que presentaron tanto el color amarillo y verde se mostró en forma de bacilos Gram negativos, se replicaron luego en agar TSA con 2% NaCl y se incubaron a 35°C. La identificación presuntiva se realizó mediante las pruebas de la oxidasa (+), mientras que a nivel de especie se llevó a cabo empleando pruebas bioquímicas con el agar Hardy Chrome.



**Figura 10.** Dilución seriada para *Vibrio* sp. y técnica de estriación de los tubos positivos.

### **2.2.5. Análisis estadístico**

Se utilizó la prueba estadística Kruskal-Wallis (que permite comparar medianas) para comparar los grupos con tres respuestas o más (sitios y meses), y la prueba Mann-Whitney para comparar dos grupos (temporada). Se utilizó el software SPSS versión 23.



# **CAPÍTULO III**

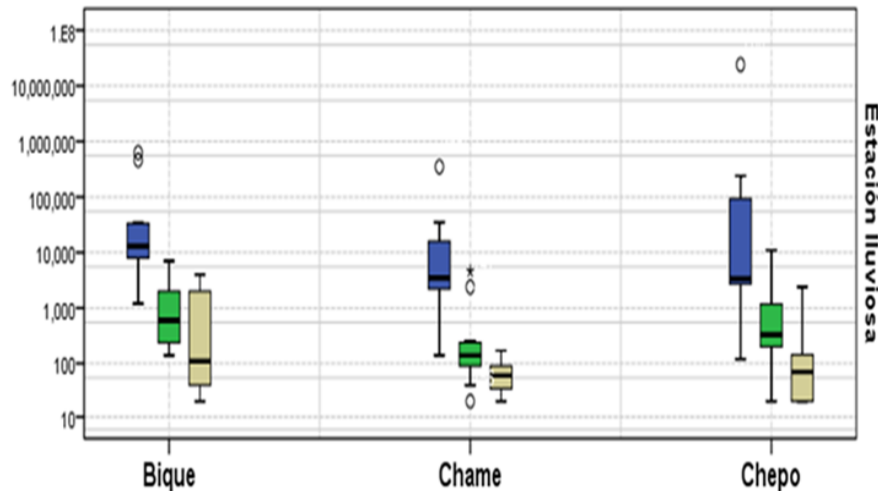
## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### 3.1 RESULTADOS

De los resultados obtenidos en la región de Chame, se puede destacar, por medio de un análisis microbiológico realizado se detectó 7200 NMP/100 g para coliformes totales, 163 NMP/100 g para coliformes termotolerantes y 60 NMP/100 g para *E. coli* (cuadro 5).

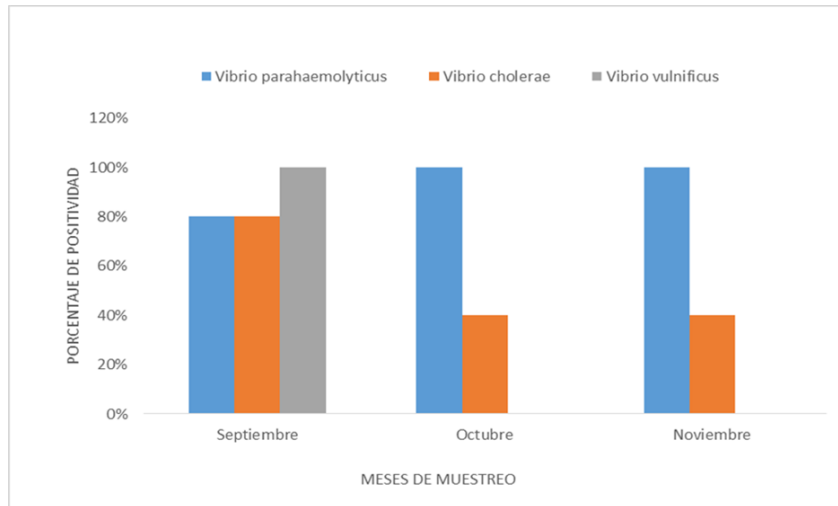
INDICADORES MICROBIOLÓGICOS	CATEGORÍAS DE LA NORMA TÉCNICA DE LA UNIÓN EUROPEA (NMP/100 gr)			MEDIAS GEOMÉTRICAS DE LA DENSIDAD DE INDICADORES MICROBIOLÓGICOS POR ESPECIE DE ALMEJA (NMP / 100 gr)			VALOR DE $p$
	A	B	C	<i>P. asperima</i>	<i>D. punctatosriatus</i>	<i>A. tuberculosa</i>	
Coliformes termotolerantes	≤ 300	≤ 6000	≤ 60000	1893	790	163	0.015
<i>Escherichia coli</i>	≤ 230	≤ 4600	≤ 46000	697	83	60	0.324
ZONA DE PRODUCCIÓN				Playa Bique	Chepo	Chame	
CATEGORÍA DE LA ZONA DE PRODUCCIÓN				B	B/A	A	

**Cuadro 5.** Categoría de la zona producción según la densidad de indicadores microbiológicos por especies de almejas.



**Figura 13.** Diagrama de cajas de los microorganismos: Coliformes totales (CT), Coliformes termotolerantes (CTT) y *E. coli* (EC) en NMP/g en los sitios Bique, Chame y Chepo durante la estación lluviosa.

En el caso de *Vibrios*, hay una prevalencia del 100% para *V. vulnificus* en septiembre y en los meses posteriores (octubre y noviembre), no hubo presencia de esta bacteria en las muestras analizadas. En el caso de *V. parahaemolyticus* se observó lo contrario a *V. vulnificus*, ya que identificó en el 100% de las muestras analizadas en octubre y noviembre, y en el 80% en septiembre (Fig.11).



**Figura 11.** Porcentaje de positividad de *Vibrio* spp. en la zona de producción de Chame.

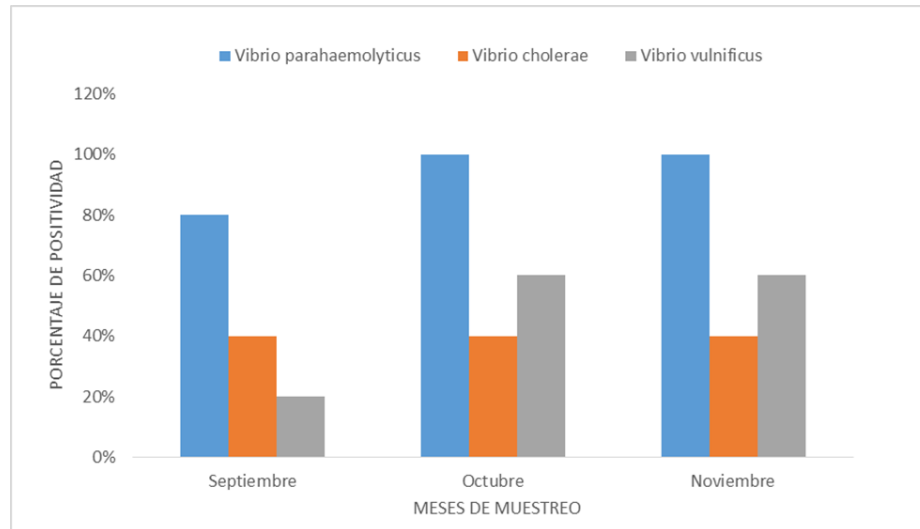
Como último punto, haciendo énfasis en *V. cholerae*, este tuvo su mayor porcentaje con 80% en las muestras de septiembre, y en octubre y noviembre solamente un 40% de las muestras analizadas (Fig. 11).

Finalmente, este lugar se puede catalogar como categoría B para coliformes termotolerantes y categoría A para *E. coli*, basado en la técnica a la Norma de la Unión Europea (sernapesca, 2018) (Cuadro 1)

La zona de producción de Bique presentó un resultado de 19400 NMP/100 g para coliformes totales, 1893 NMP/100 g para coliformes termotolerantes y 697 NMP/100 g para *E. coli* (cuadro 6).

Para *V. parahaemolyticus*, hubo un mayor grado de positividad en octubre y noviembre con 100% de las muestras analizadas y 80% en septiembre. Para *V. vulnificus* se estima un 60% de positividad en octubre y noviembre, y 20% en septiembre. Como último a mencionar, *V. cholerae* fue el de menor porcentaje de positividad en las muestras analizadas con 40% para los tres meses de muestreo

(Fig.16). Esta zona pudo ser catalogada en categoría B, basado en la Norma Técnica de la Unión Europea (Sernapesca,2018) (Cuadro 5).

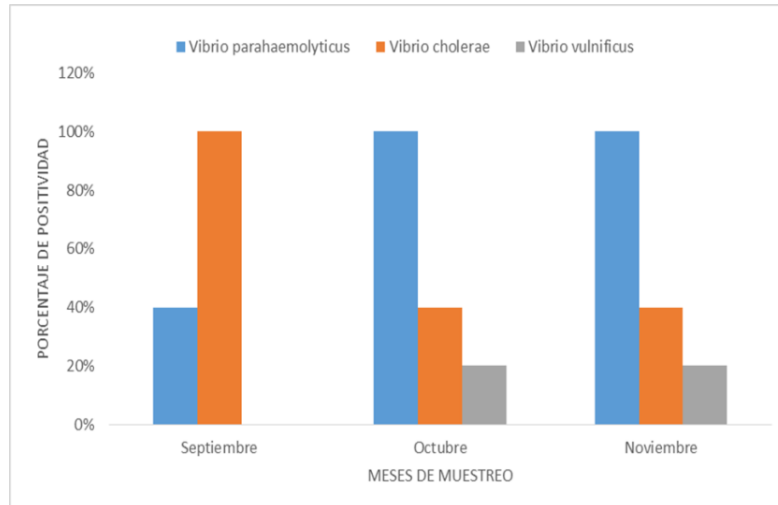


**Figura 16.** Porcentaje de positividad *Vibrio* spp.en la zona de producción de Bique.

Finalmente, Chepo arrojó un resultado de 55 233 NMP/100 g para coliformes totales, 790 NMP/100 g para coliformes termotolerantes y 83 NMP/100 g para *E. coli* (cuadro 5). Por lo cual, al comparar si existen diferencias estadísticas, se pudo observar que los coliformes termotolerantes reflejaron diferencia significativa, mostrando un valor de p de 0.015, mientras que para coliformes totales y *E. coli*, no se detectaron diferencias significativas.

Con relación a *V. cholerae*, se detectó 100% de positividad de las muestras analizadas durante septiembre, mientras que en octubre y noviembre descendió hasta un 40%. En contraste, *V. parahaemolyticus* se detectó en 40% de las muestras analizadas en septiembre y aumentó hasta un 100% en octubre y noviembre. Para *V. vulnificus*, no se detectó en septiembre y solo se detectó en el 20% de las muestras analizadas de octubre y noviembre (Fig.16).

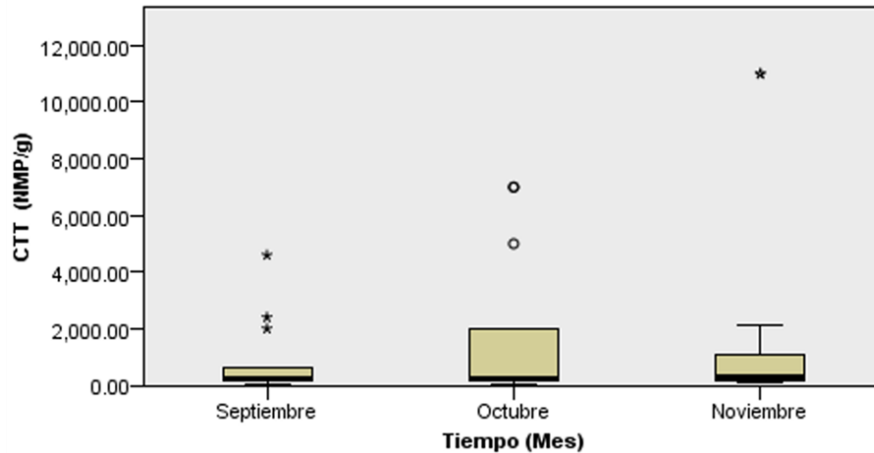
En concreto, esta zona pudo ser catalogada en la categoría A, bajo la Norma Técnica de la Unión europea (sernapesca,2018 (Cuadro 5).



**Figura 18.** Porcentaje de positividad de *Vibrio* spp. en la zona de producción de Chepo.

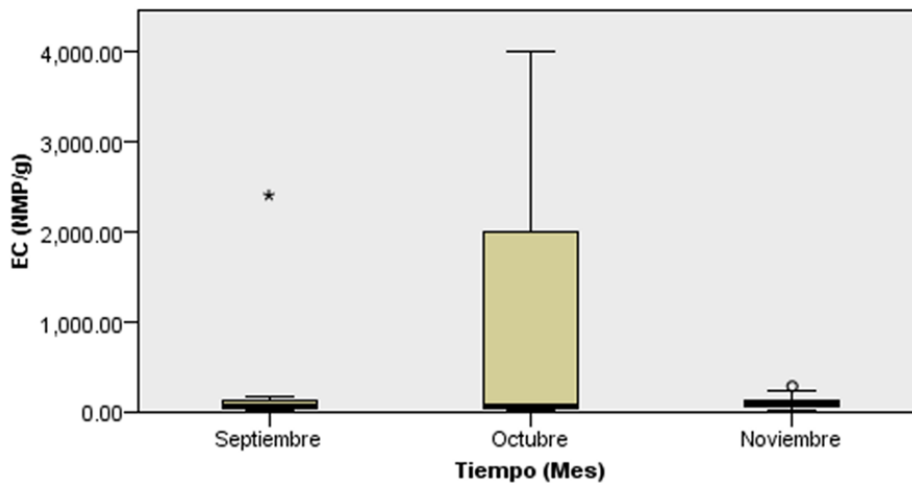
### 3.1.1 Meses de muestreo

En cuanto a los valores de coliformes totales y termotolerantes durante los meses de muestreo, fueron distribuidos de la siguiente manera: en septiembre se detectó 7200 NMP/100 g para coliformes totales y 243 NMP/100 g para coliformes termotolerantes. En octubre se detectó 17100 NMP/100 g para coliformes totales y 1763 NMP/100 g para coliformes termotolerantes. En noviembre, se detectó 57533 NMP/100 g para coliformes totales y 840 NMP/100 g para coliformes termotolerantes (Fig. 15).



**Figura 15.** Diagrama de caja en relación a los meses de muestreo para coliformes termotolerante.

En el caso de *E. coli* se comportó de la siguiente manera: en septiembre se detectó 53 NMP/100 g, en octubre se detectó 683 NMP/100 g y en noviembre se detectó 103 NMP/100 g (Fig. 15).



**Figura 15.** Diagrama de caja en relación con los meses de muestreo para *E.coli*.

Al comparar si existen diferencias significativas durante los meses de muestreos, se pudo observar que no hubo diferencias significativas entre los meses de muestreos, ya que poseen valores de coliformes termotolerantes con una p de 0.842 y de *E. coli* una p de 0.766.

En base la norma Técnica de la Unión Europea para la calidad de los moluscos bivalvos, se tomó como referencia NMP de coliformes. Dicho esto, las diferentes zonas de producción según los coliformes termotolerantes, pudo ser catalogada en la categoría A para septiembre y noviembre y en una categoría B para octubre (Cuadro 6). En base a presencia de *E. coli*, septiembre y noviembre, pudo ser catalogados en la categoría A y octubre, en la categoría B (Cuadro 5).

INDICADORES MICROBIOLÓGICOS	CATEGORÍAS DE LA NORMA TÉCNICA DE LA UNIÓN EUROPEA (NMP/100 gr)			MEDIAS GEOMÉTRICAS DE LA DENSIDAD DE INDICADORES MICROBIOLÓGICOS POR ESPECIE DE ALMEJA (NMP / 100 gr)			VALOR DE $p$
	A	B	C	<i>P. asperrima</i>	<i>D. punctatostriatus</i>	<i>A. tuberculosa</i>	
Coliformes termotolerantes	≤ 300	≤ 6000	≤ 60000	<b>1893</b>	<b>790</b>	<b>163</b>	<b>0.015</b>
<i>Escherichia coli</i>	≤ 230	≤ 4600	≤ 46000	<b>697</b>	<b>83</b>	<b>60</b>	<b>0.324</b>
<b>ZONA DE PRODUCCIÓN</b>				Playa Bique	Chepo	Chame	
<b>CATEGORÍA DE LA ZONA DE PRODUCCIÓN</b>				<b>B</b>	<b>B/A</b>	<b>A</b>	

**Cuadro 5.** Categoría de la zona producción según la densidad de indicadores microbiológicos por especies de almejas.

INDICADORES MICROBIOLÓGICOS	CATEGORIA DE LA NORMA TECNICA DE LA UNION EUROPEA (NMP/100 gr.)			MEDIDAS GEOMETRICAS DE LA DENSIDAD DE INDICADORES MICROBIOLÓGICOS POR MES DE MUESTREO (NMP/100gr)			VALOR DE p
	A	B	C	SEPTIEMBRE	OCTUBRE	NOVIEMBRE	
<i>Coliforme termotolerante</i>	≤ 300	≤ 6000	≤ 60000	243	1763	840	0.842
<i>Escherichia coli</i>	≤ 230	≤ 4600	≤ 46000	53	683	103	0.766
CATEGORIA DE LA FECHA DE COLECTA							
				A	B	B/A	

**Cuadro 6.** Categoría de la zona producción la densidad de indicadores microbiológicos por mes de muestreo.

### 3.2 DISCUSIÓN

Los resultados para la zona de producción de El Espavé, mostró que el grado de coliformes termotolerantes no dista tanto del valor límite concebido por la Norma de la Unión Europea (Sernapesca,2018) cuya cantidad necesaria para ser considerada dentro de una categoría A, fue de 163 NMP/100g, por consiguiente, 300 NMP/100 g es el límite óptimo para que así sea catalogada. En otro punto, *E. coli* también está dentro de la misma categoría A, con un valor de 60 NMP/100 g, que también está dentro de los 230 NMP/100 g estimados para esta categoría. En comparación a lo encontrado por Garrido *et al.* (2018), donde dicha zona fue definida como categoría C y A, para coliformes termotolerantes y para *E. coli*, respectivamente.

En primera instancia, solo existe diferencia de categorización, cuando se hace referencia a coliformes termotolerantes, reflejando una mejora en la zona con respecto al 2018, ya que descendió en dos categorías, de C a A. Esto radica en que la carga de coliformes termotolerantes disminuyó, por lo que pasó de ser una zona de categoría C a ser una zona de categoría A. La posible explicación a estos resultados, es que los bivalvos tienden aumentar o disminuir su carga microbiana dependiendo del grado de contaminación presente en el agua.



En comparación de los resultados de este estudio con los de Gómez *et al.* (2016), son bastante compatibles, porque ambos estudios colocan a esta zona de producción en la categoría A, tomando en consideración que ha pasado un lapso de seis años y no hay una variabilidad notable en ambos resultados. Esto quiere decir, que, a la hora del consumo de estos bivalvos, se puede consumir directamente, según las Normas Técnicas de la Comunidad Europea. (Sernapesca,2018)

En comparación con el estudio realizado por Saldaña *et al.* (2006), si hay diferencia con relación a los coliformes termotolerantes, puesto que las autoras trabajaron en aquel entonces el grupo de bacterias llamadas coliformes fecales.

Al compararlo con el estudio realizado por Hidalgo (2019) en Ecuador, se encontró que los valores de coliformes totales en *Anadara similis* y *Anadara tuberculosa* están en una categoría C, lo que denota una contaminación fecal elevada en los esteros estudiados, a diferencia de los encontrados en la zona de El espavé, donde *Anadara tuberculosa*, posee el valor de coliformes termotolerantes más alto, ubicándose en la categoría B, pero en el caso de *E. coli* el valor es inferior y se ubica en la categoría A. De acuerdo con el Reglamento CE N°854/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, el límite máximo permisible de *E. coli* es de 230 NMP/100 g, y los resultados obtenidos en el estudio de Hidalgo (2019) están en un rango entre  $4 \times 10^3$  y  $2 \times 10^7$  UFC/100 g, por lo cual, se puede determinar que de acuerdo con la calificación que dictamina este reglamento (categoría C) según el Art. 5 del Anexo 2, estos moluscos no son aptos para el consumo humano. (Sernapesca,2018).

A partir de los datos reunidos durante los tres meses de muestreo en la época lluviosa del 2020, se encontraron relaciones porcentuales muy semejantes entre las diferentes especies de bacterias del género *Vibrio* spp., haciendo mención en primer grado a la prevalencia de *V. vulnificus*, marcando una totalidad en las muestras obtenidas, de un 100%, siendo esta la más destacada en el mes de septiembre. Sin embargo, en los meses posteriores, no hubo presencia de esta bacteria, pero prevalecieron la especie de *V. parahaemolyticus* con un 100% y de *V. cholerae* con 40%. La posible razón que justifica el elevado índice de

positividad de esta zona, podría ser debido a los factores ambientales, muy propios de la temporalidad lluviosa, lo que generó un gran aumento de la población microbiana de nuestros resultados, dificultando la distinción de las características bacterianas sugeridas por la literatura. Posteriormente, se optó por utilizar una mayor dilución, que permitió obtener una mayor cantidad de aislamientos.

Para la zona de producción de Playa Bique, se obtuvo una carga microbiana de 1893 NMP/100 g de coliformes termotolerante y 697 NMP/100g en *E. coli*. Esto determinó que está dentro de la categoría B para ambos indicadores, de acuerdo con la Norma Técnica de la Unión Europea. (sernapesca,2018) Esta norma señala que los moluscos pueden ser recolectados en estado fresco y se pueden comercializar para el consumo humano, pero antes tienen que pasar por un tratamiento en un centro de depuración, de modo que cumplan las normas sanitarias exigidas en las zonas de categoría A. (Sernapesca,2018)

Comparado este estudio con el de Saldaña *et al.* (2006), esta zona se mantuvo en la categoría B. Sin embargo, hay una discordancia con respecto a los valores obtenidos en este estudio, puesto que se cuantificaron 452.0 NMP/100 g de coliformes termotolerantes y 1363 NMP/100 g de *E. coli*, y en este estudio, fue lo contrario. Este hecho puede ser atribuido, al aumento de población en dicha zona de producción y también, a otros factores como las embarcaciones que transitan por el área del canal y las propias de la Bahía de Bique (Elikagaien, 2013).

En comparación con el estudio de Gómez *et al.* (2016), también estuvo en la categoría B, con valores que estuvieron dentro de las 3752.1 NMP/100 g, tanto para coliformes termotolerantes como *E. coli*, con lo cual, después de 10 años con respecto al estudio de Saldaña *et al.* (2006), se puede ver que los valores han aumentado, pero no hay un cambio de categoría como tal.

Por otra parte, el estudio realizado por Garrido *et al.*, 2018, no coincide con los estudios ya antes mencionados, debido a que los valores obtenidos eran demasiado elevados para ser considerada en una zona de categoría B, por consiguiente, resultó estar en categoría C y también, al compararlo con el

presente estudio, no hubo concordancia, a pesar de que se llevó a cabo en la misma zona.

La contaminación por coliformes termotolerante y *E. coli* es debido a que en el sector no hay un adecuado sistema de tratamiento de aguas residuales. En un río de la localidad se construyó recientemente una planta residencial que abastece una barriada cercana, la cual desemboca en la playa (Montenegro, 2019). Se presume, que este sea el motivo que está perjudicando a todos los organismos que habitan en este ecosistema, por ende, afecta la calidad de los moluscos bivalvos recolectados en este sitio. Por esto, se ofrece una propuesta de depuración de los organismos, para que estos sean tratados antes de su comercialización y así, poder brindar un producto de mejor calidad a los consumidores de este alimento.

En cuanto a los análisis realizados para las especies de *Vibrio*, se mostró una mayor prevalencia de *V. parahaemolyticus*, en los tres meses de muestreo. También, se obtuvieron aislamientos de *V. vulnificus* y de *V. cholerae*, observándose este último, niveles muy bajos de positividad. Por el contrario, Gómez *et al.* (2016), obtuvieron mayor número de aislamiento para *V. cholerae*, a pesar de contar con los niveles de *Vibrio* spp. más bajos, pero no reportaron *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus*, a diferencia de los observado en este estudio, donde se pudo aislar estas 2 especies de *Vibrio*.

Esto indica que las alteraciones climáticas, los parámetros hidrobiológicos de los ecosistemas marinos se alteran, aumentando el fitoplancton y zooplancton, lo que establece una persistencia y diseminación del *V. cholerae* y *V. parahaemolyticus* (Vezzulli *et al.*, 2013).

Con respecto a la zona de producción de Playa Chinina, se observó un valor de 790 NMP/100 g de coliformes termotolerantes, por lo cual, se considera en una categoría B. Mientras que *E. coli* fue de 83 NMP/100g, por ende, se puede decir que está en una categoría A. Por lo cual, estos moluscos bivalvos se pueden consumir directamente, sin necesidad de un tratamiento térmico y/o proceso de depuración según nuestros resultados, según la Norma Técnica de la Comunidad Europea. (Sernapesca,2018)

La zona de producción de Chinina en Chepo, está dentro de la categoría B, para coliformes termotolerantes. Por lo cual, se recomienda aplicarle un tratamiento térmico previo o de depuración, antes de ser consumido. En cuanto a los resultados de Garrido *et al.* (2018), esta zona estuvo en categoría C, teniendo un valor de 170951.9 NMP/100 g, por lo tanto, requieren someterse a un tratamiento en una zona de reinstalación durante un periodo prolongado de tiempo no inferior a dos meses para la eliminación de microorganismo que representen un riesgo a la salud humana.

El valor de *E. coli* es propio de una zona de categoría A. Esto quiere decir que la zona se mantiene con un nivel bajo de contaminación y a pesar de la gran demanda de viviendas de los alrededores, no se ha visto tan afectada con el pasar de los años.

En comparación con el estudio de Garrido *et al.* (2018), cuyos resultados categorizan esta zona como B, donde los valores fueron de 1549.1 NMP/100 g, indicando un bajo nivel de contaminación en la zona por *E. coli*, reflejando un lugar mucho más salubre y permitiendo que se puedan realizar ventas de este tipo de bivalvos para el consumo, sin que haya un riesgo de infección por esta bacteria.

También, se buscan ciertas semejanzas con otros estudios, en este caso con el de Saldaña *et al.*(2006), donde determinaron que la zona de producción estaba enmarcada dentro de la categoría B, debido a que mostró un valor de 2120 NMP/100 g, por lo tanto, se puede deducir que a pesar de que tuvo valores considerables en ese año, se ha visto mermado con el pasar del tiempo, más precisamente, se puede ver representado en este estudio. Según CGR (2021), hubo un descenso del 26.94% en un margen de doce años. Esto puede ser una posible causa del deterioro de la calidad del agua debido al crecimiento de la población humana, la expansión de la actividad industrial y agrícola, la falta de conciencia humana, deforestación y la amenaza del cambio climático son factores por tomar en consideración como razones de importantes alteraciones en el ciclo hidrológico.

En relación con los datos, se plantea que *V. cholera* se detectó más en septiembre. La explicación a esto puede ser debido al alto índice de lluvias

durante este mes, ya que coinciden en que las bacterias del género *Vibrio* sp., se sumergen en el agua (Hervio-Heath *et al.*, 2002; Tantillo *et al.*, 2004). En comparación con el estudio de Gómez *et al.* (2016), tomando de referencia una localidad diferente a la nuestra, específicamente en la zona de producción de la Playa El Salado en Aguadulce, solo se detectó la presencia de *V. cholera*, teniendo en cuenta que los muestreos fueron realizados entre los meses de julio a septiembre de 2015. Esto plantea la posibilidad de que septiembre sea el mes donde hay una mayor variabilidad en el crecimiento de *V. cholera*.

En Panamá, AUPSA (2016), ha detectado la presencia de *V. cholera* no asociado a los serogrupos O1 y O139 en productos pesqueros provenientes de Vietnam, también se habla de hepatitis, pero con una baja cantidad de caso que se reporta anualmente (MINSA 2014).

Con respecto a *Vibrio* spp., en la región se han desarrollado una serie de investigaciones relacionadas a este tema, de las cuales se puede destacar la de Quiñonez-Ramírez *et al.* (2000), donde se trabajó con 260 muestras de almejas a lo largo de un ciclo anual, en la porción del Estado de Veracruz, Golfo de México sus resultados tuvieron un fueron muy similar a los encontrados en este estudio, donde se encontró la presencia del 21.5% de *V. cholerae* no O1 y 7% de *V. cholerae* O1 Inabatoxigénico. Al compararlo con los resultados de este estudio, *V. cholerae* se manifestó de manera significativa, rebasando en la mayoría de los casos un margen del 40% de positividad y en el mes de septiembre, incluso se vio en mayor porcentaje, llegando a encontrarse hasta en el 80% y 100% de las muestras analizadas, en las regiones de Chame (El Espavé y Chepo (Chinina), respectivamente.

A lo largo de la región latinoamericana se han realizado diversos estudios respecto al género *Vibrio* sp. según (Aliaga *et al.*, 2010). De 254 muestras tomadas de un mercado pesquero de Lima (Perú), se analizaron y obtuvieron 15 cepas de *V. parahaemolyticus*, de las cuales 9 fueron obtenidas de pescado y 6 a partir de moluscos bivalvos. Representando por 5.9% de las muestras totales, en comparación al 80% reflejado en la investigación presente. Se puede atribuir esta

divergencia a que los países de Panamá y Perú no comparten la misma temporalidad estacionario, más si cuentan con accesibilidad al mar. Por ende, se esperaba un resultado similar.

En contraparte, un estudio realizado en las Costas de Thailandia, demostró que *V. parahaemolyticus* fue encontrada con mayor frecuencia en ostras del Pacífico (*Crassostea gigas*) originaria del sur de China, cuyo índice de positividad rondaba los 89.3% según (Chen *et al.*, 2010). Además, se vio evidenciada la presencia de la cepa patogénica en un 12% de las muestras y 22% de *V. vulnificus*.

Usando como énfasis, lo planteado por Lopéz (2012), cuya investigación tuvo de objeto la detección, aislamiento y caracterización de *V. parahaemolyticus* a partir de bivalvos en la costa mediterránea, al estudio de su prevalencia y de sus relaciones con otras cepas de origen europeo. Además, se procedió al desarrollo de un modelo de experimentación *in vivo* para la exposición de almejas con cepas seleccionadas representativas de las variantes patogénica y no patogénica de *V. parahaemolyticus*.

El género *Vibrio* comprende 75 especies, de ellas 12 son consideradas patógenas para el ser humano, siendo *V. cholerae* el que mayores estragos ha generado a lo largo de las 8 pandemias producidas desde inicios del siglo XIX. El Perú fue azotado por 3 de éstas, la última ocurrida en 1991. Luego de controlada la epidemia, los casos de gastroenteritis por *V. cholerae* se han presentado de forma esporádica. Sin embargo, como consecuencia de los cambios climáticos generados por el calentamiento global, hay evidencia del resurgimiento del género *Vibrio*, presentándose casos de gastroenteritis reemergentes en diferentes partes del mundo, producidos por otra especie del género *Vibrio*, como el *V. parahaemolyticus*.

Con respecto a los meses de muestreo, las tres zonas de producción, en cuanto a población microbiana se refiere, obtuvieron niveles aceptables tanto de coliformes termotolerantes como para *E. coli*. En perspectiva, los resultados estuvieron por debajo del límite mínimo para adjudicar que se encuentra en la categoría A y B.

Con los resultados presentados a continuación, se puede señalar que los productos bivalvos de estas zonas son aptos para el consumo directo al reflejar una baja contaminación microbiana.

En comparación con este estudio, las investigaciones de Saldaña *et al.* (2006) y compara con otros estudios internacionales Gómez *et al.*, 2016. se puede decir que, desde el mes de septiembre a octubre, está en una categoría A y B, respectivamente. Por lo que, no hubo gran cambio en las categorías. En comparación con el estudio de Garrido *et al.* (2018), los resultados dieron en una categoría B y C, respectivamente, por lo tanto, es recomendable que para la categoría B se debe ocupar un tratamiento de depuración. Para la categoría C, se debe implementar un tratamiento de reinstalación o cocido bajo un proceso térmico aprobado, por lo que debemos recordar que no se debe aplicar el mismo tratamiento en ambas zonas. Mediante los resultados obtenidos en los meses de muestreo de septiembre, octubre y noviembre, demuestran que la zona del Espavé es apta para la comercialización de bivalvos, ya que mostro una categoría A, en cambio la zona de Bique y Chepo (Chinina), mostraron una categoría B, por lo que hay que tener un mayor grado de depuración para poder ser comercializada.

Se debe recordar que la única zona que puede ser comercializada directamente es la Categoría A, porque no necesita pasar por un proceso de depuración, pero en la categoría B y C, debe ser antes depurada para luego ser comercializada. En nuestro país no ocurre esto, ya que el producto es llevado directamente al mercado y esto dependerá de las personas que le den un buen cocimiento, para eliminar los posibles patógenos que puedan tener. Según Carreño (2019), al comparar los niveles de contaminación en diversos estudios desarrollados tanto a nivel nacional e internacional con los resultados obtenidos en este estudio, se puede presumir que todas las especies de moluscos bivalvos bioacumulan enterobacterias de origen fecal, con una marcada variabilidad en sus concentraciones en las diferentes especies de bivalvos con características filtradoras que habitan en humedales marinos costeros, asumiendo que esto se debe a la ubicación geográfica de las Ciudades o pequeñas Poblaciones de

Comunidades que se han desarrollado en los estuarios y las condiciones del mal manejo de aguas residuales de estas zonas de influencia las cuales son descargadas directamente al estuario sin previo tratamiento, alterando como consecuencia los parámetros fisicoquímicos del agua.

En Venezuela un estudio desarrollado por Sarcos y Botero (2005), analizó el nivel de coliformes totales y *E. coli* en almejas de la especie (*Polymesoda solida*). Y dio como resultado concentraciones variables que van desde 1.8 x - 9.2 x NMP/100 g de Coliformes totales y valores significativos de *E. coli* que van desde 1.8 x - 1.9 x NMP/100 g. Lo que demuestra que en otros países se han desarrollado investigaciones similares en diferentes especies de moluscos bivalvos, los cuales muestran valores inferiores de Coliformes totales en sus resultados, pero muestran un alto índice de contaminación por *E. coli* a diferencia de los encontrado en este estudio.

Así mismo se llevó a cabo un estudio por González (2014), donde se realizó una evaluación bacteriológica del ostión americano *Crassostrea virginica* en las lagunas de manglares de Tampamachoco, Veracruz, México en los meses de Abril a Septiembre donde se detectó que en el mes de abril se registraron los valores más bajos siendo estos de 11 NMP/100 g para Coliformes totales y de 3 NMP/100 g de coliformes fecales los cuales incrementaron notablemente para los meses de agosto y septiembre llegando a registrar valores mayores de 1100 NPM/100g, tanto para coliformes totales como para coliformes fecales.



**CAPÍTULO IV**  
**CONCLUSIONES Y**  
**RECOMENDACIONES**

#### 4.1 CONCLUSIONES

1. Se determinó una mayor densidad de carga microbiana de coliformes termotolerantes y *E. coli* en la zona de producción de Bique, en comparación a la zona de producción de Chame y Chepo.
2. La Zona de producción de Chame y Chepo están dentro de la categoría A, en base a la carga de *E. coli*. Sin embargo, las Zonas de producción de Bique está dentro de la categoría B, en base a la carga de *E. coli*.
3. La Zona de producción de Chame está dentro de la categoría A. Sin embargo, las Zonas de producción de Bique y Chepo están dentro de la categoría B en base a la carga de coliformes termotolerantes.
4. Los meses de octubre y noviembre están en la categoría B, sin embargo, el mes de septiembre está dentro de la categoría A, en las tres zonas de producción, tomando como base la carga de coliformes termotolerantes,.
5. El mes de octubre está en la categoría B, sin embargo, los meses de septiembre y noviembre están dentro de la categoría A, en las tres zonas de producción, tomando como base la carga de *E. coli*.
6. El *V. parahaemolyticus* es la especie de *Vibrio* spp. predominante en las tres zonas de producción estudiadas. El *V. cholerae* fue la especie de *Vibrio* spp. que menos se detectó en las tres zonas de producción.
7. El *V. vulnificus* tuvo un menor porcentaje en los meses de octubre y noviembre en las zonas de producción de Bique y Chepo.

## 4.2 RECOMENDACIONES

1. Para una futura investigación, es preferible trabajar las muestras de *Vibrio* spp. de inmediato, puesto que están sujetas a morir debido al largo periodo de criopreservación.
2. A la hora de realizar el tratamiento y dividir los grupos de investigación, debe asignarse un grupo de estudiantes específicamente para trabajar *Vibrio* spp. y otras especies de bacterias patógenas, para obtener un mejor resultado.
3. Es preciso tomar en consideración la medición de algunos factores físico-químicos que se encuentren en el entorno del muestreo, como lo son la salinidad, pH y temperatura, son buenas variables para compararlos con los resultados obtenidos.
4. Se debe hacer, un sondeo preliminar en las zonas de producción, para poder evaluar el nivel de contaminación y el número de habitantes aproximado que se encuentra en ese lugar, ya que esto podría dar una mayor perspectiva del estado de estas zonas de producción, antes de empezar el próximo estudio.

# **BIBLIOGRAFÍA**

- Alcánta, A. 2015. Los Bivalvos, Moluscos de ayer, hoy y siempre: Almejas, Ostras, Mejillones. Gaceta Digital UNAM. México. 4729(5) pp.
- American Public Health Association (APHA). 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (21st Ed.). Washington, DC: American Public Health Association.
- Anderson, K. L.; J.E. Whitlock y V.J. Harwood. 2005. Persistence and differential survival of fecal indicator bacteria in subtropical waters and sediments. Appl Environ Microbiol; 71(6):3041–3048.
- Administración Nacional de Medicamento, Alimentos y Tecnología médico (ANMAT) 2011. Cólera Enfermedades transmitidas por alimentos. Ficha técnica N°2. 1
- Autoridad Panameña de seguridad de alimentos (AUPSA). 2016. Suspenden importación proveniente de Vietnam. Obtenido de [http://www.aupsa.gob.pa/aupsaweb/index.php?option=com\\_content&view=article&id=484Itemid=121](http://www.aupsa.gob.pa/aupsaweb/index.php?option=com_content&view=article&id=484Itemid=121).
- Berdiales J. 2009. Informe del componente de manglar región de panamá oeste. Ministerio de ambiente. 2-9 pp.
- Campos, B. y Díaz, P. (2007). Distribución y abundancia de larvas de moluscos gasterópodos y bivalvos en fiordos y calanes del sur de Chile. Ciencia y Tecnología del Mar; 30(1):115-132.
- Campos Machados, S., 2007. Determinación de Coliforme Fecales en ejemplares de *Protothaca aspérrima* en Cuatro ecosistemas Estuarios de la Zona Oriental de El Salvador. Tesis de licenciatura. Universidad de El Salvador.
- Canadian shellfishsanitationprogram. 2010. Manual Operations Chapter2. Growing áreasurevy and clasiffication. Annex 2B, Bacteriologicalprocedures.
- Carreño Rosario, H. N. 2019. Contaminación por Coliformes totales y *E. coli* en Ostiones (*Crassostreacolumbiensis*), concesión de manglares, Puerto Salinas-Golfo de Guayaquil, Facultad de Ciencias Naturales. Universidad de Guayaquil-Ecuador.

- Carvajal G. y Williams R. 2003. Determinación de la calidad higiénico- sanitario de los bivalvos *Donaxpanamensis* y *Protothacaasperrima* de venta en el mercado del marisco. Tesis de licenciatura. Universidad de Panamá 2003.
- Castañeda, M.; S. Pardío; E. Orrantia y F. Lango. 2005. Influence of water temperature and salinity on seasonal occurrences of *Vibrio cholerae* and enteric bacteria in oyster-producing areas of Veracruz, México. *Mar Poll Bull*; 50(12):1641-164.
- Castilla, M. 2007. Transferencia tecnológica en el cultivo de ostras *Crassostreagigas*, A grupos organizados, Punta morales, Puntarenas, Costa Rica. Título Técnico en acuicultura. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Center for disease control and prevention (CDC). 2017. *Vibrio* species causing vibriosis.
- Contraloría General de la República de Panamá (CGR). 2021. censo de población y vivienda. Instituto de estadística y censo (INEC).
- Cumbicos, D. y Ruiz, J. 2017. Ciclo de proliferación de cepas bacterianas *Vibriospp.* y *Pseudomonasspp.* en juveniles de concha prieta (*Anadara tuberculosa*). *Revista Espacios*; 39(13):14.
- Daniels, N. A.; B. Ray; A. Easton; N. Marano; E. Kahn; A.L. McShan II y J.G. Wells. 2000. Emergence of a new *Vibrio parahaemolyticus* serotype in raw oysters: a prevention quandary. *JAMA*; 284(12):1541–1545.
- Darrigran, G. y Damborenea, M. C. 2017. La colección de moluscos del Museo de La Plata. Museo. Díaz-Merlano, J. y Puyana-Hegedus, M. (1994). Moluscos del Caribe colombiano. Un catálogo ilustrado. Editorial Presencia. Colciencias-Fundación Natura-Invemar, 291 pp.
- Delgado, J., y García, A. 2010. Determinación de la Composición y Abundancia de Almejas de los géneros *Protothaca* y *Chione* en una Zona Intermareal en el Río Chone. Tesis de Licenciatura en Acuicultura., 83. Manabí, Ecuador: Universidad Técnica de Manabí.

- De la Lanza G.; S. Hernández y J.L. Carvajal. 2000. Organismos indicadores de la calidad del agua y de la contaminación (bioindicadores). Editores México por Plaza y Valdés, S.A. 73 pp.
- Eaton, A.; L. Clesceri; E. Rice; A. Greenberg y M. Franson. 2005. Standard Methods for the Examination of water and wastewater. Centennial 21 St. Edition. Washington. D.C.
- EcuRed. 2010. Historia de Chame. Panamá. Obtenida de: [https://www.ecured.cu/Distrito\\_Chame](https://www.ecured.cu/Distrito_Chame).
- Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria (ELIKA). 2012. Moluscos Bivalvos medidas para evitar riesgos; 32:1-3.
- Elikagaien N. 2013. Moluscos Bivalvos: medidas para evitar riesgos. Fundación vasca para la seguridad Agroalimentaria. Obtenido de: [http://www.eika.eus/es/pesca\\_contaminantes.asp=?id=1321](http://www.eika.eus/es/pesca_contaminantes.asp=?id=1321).
- Escobar, J. 2002. La Contaminación de los ríos y sus efectos en las áreas costeras y mar Santiago, Chile CEPAL- SERIE Recursos naturales e infraestructura; N° 50.
- Figueroa, B. 2008. Contaminación de origen fecal en el corredor costero Barra de Tonameca Bahía de Puerto Ángel La Mina, Oaxaca, México. Rev. Ciencia y Mar; 11(33):15–28.
- Flores, E. 2018. Investigador auxiliar del Centro de Investigaciones Pesqueras en Ostión. Recuperado 2018. 1 pp. [https://www.ecured.cu/Osti%C3%B3n#El\\_osti.C3.B3n\\_como\\_alimento](https://www.ecured.cu/Osti%C3%B3n#El_osti.C3.B3n_como_alimento)
- Furfari, S. 1991. Manual de adiestramiento sobre un programa básico de saneamiento de moluscos bivalvos. Curso desarrollado por Food and Drug Administration (F.D.A.) para Venezuela, Fundación La Salle de Ciencias Naturales, Campus de Margarita.
- Garrido L., A. Robinson y N., Sánchez. 2018. Determinación de la calidad microbiológica de las zonas producción de los bivalvos *Donax punctatosriatus*, *Protothaca asperrima* y *Anadara turberculosa* en Panamá. Tesis de licenciatura. Universidad de Panamá 2018.

- Gavilán, R. y J. Martínez. 2011. Factores ambientales vinculados con la aparición y dispersión de la epidemia de *Vibrio* en América del sur. *Rev.PerúMedExp Salud Pública*;28(1):109 – 15 pp.
- Ghose, A. 2011. Lessons from cholera & *Vibrio cholerae*. *Indian J Med Res*;133:164-170.
- Gómez G., I. Yau y I. Guevara. 2016. Calidad Microbiológica de las zonas de producción de los bivalvos *Anadaragrundis*, *Protothacaasperrima* y *Anadara tuberculosa* en Panamá. Tesis de licenciatura. Universidad de Panamá. 2016
- González-Solis, A., Torruco, D. y Torruco-González, Á. D.2018. Comparative analysis of mollusks in the Los Petenes Biosphere Reserve and coastal lagoons in southeastern Mexico. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras-INVEMAR*, 47(1), 25-44 pp.
- González, C. 2014. Evaluación bacteriológica del ostión americano *Crassostrea virginica*, (Gmelin, 1971) en la laguna de Tampamachoco, Veracruz, durante el periodo abril septiembre 2014.
- Grabow, W.; J. De Villiers y C. Schildhauer. 1992. Comparison of selected methods for the enumeration of fecal coliforms and *E. coli* in shellfish. *Appl Environ Microbiol*; 58(9):3203 – 3204 pp.
- Gray, J.E. 1847. Characters of six new genera of bats not hitherto distinguished. *ProceedingsoftheZoologicalSocietyof London 1847*:14 – 16 pp.
- Guía para la evaluación de laboratorios bacteriológicos de análisis de agua. (CEPIS). 2011. Serie documentos técnicos N.º 3. Edición revisada. Lima, CEPIS, 1078 pp.
- Guerrero, J. 2010. Puerto Coquira. Panamá. Obtenida de: [www.actiweb.es/jessyguerrero/puerto\\_coquira.htm](http://www.actiweb.es/jessyguerrero/puerto_coquira.htm).
- Guerrero B., M.; Reyes G., U.; Soria S., F.M. y Espinosa S., M.C.2022. Colera. *Enf INF Microbiol* 42 (1): 21-28.
- Helm, M.; N. Bourne y A. Lovatelli. 2006. Cultivo de bivalvos en criaderos. Un manual práctico.FAO documento técnico de pesca N°471. Roma, FAO. 182 pp.



- Herrmann, M.; M. L. Lepore; J. Laudien; W. E. Arntz y P.E. Penchaszadeh. 2009. Growth estimations of the Argentinean wedge clam *Donax hanleyanus*: A comparison between length-frequency distribution and size-increment analysis. *J Expl Marine Biol Ecol*; 379:8-15 pp.
- Hervio- Heath D., Cowell R., Derrien A., Robert-Pillot A., Fournier J.M. y Pommeputy M. 2002. Occurrence of Pathogenic *Vibrio* in coastal areas of France. *J Appl Microbiol*; 92:1123 – 35 pp.
- Hidalgo V., A.P. 2019. Contaminación por coliformes totales y *E. coli*, en concha (*Anadara tuberculosa* y *Anadarasimilis*) Jambellí, Prov.- El Oro. Tesis de Ingeniera Ambiental., 87. Guayaquil, Ecuador: Universidad Guayaquil.
- Iriarte R., M. M. 2015. Estudio sanitario de áreas de crecimiento y cosecha de moluscos bivalvos en Venezuela. *Rev. Memoria de Fundación La Salle de Ciencias Naturales 2017 ("2014")*; 74(181-182):143-159 pp.
- Iwamoto, M.; T. Ayers; B. Mahony D. Swerdlow. 2010. Epidemiology of Seafood Associated Infections in the United States. *Clin Microbiol Rev*; 23(2):399 – 411 pp.
- Kay, D.; S. Kersaw; R. Lee; M. Wyer; J. Watkins y C. Francis. 2008. Results of field investigations into the impact of intermittent sewage discharges on the microbiological quality of wild mussels (*Mytilus edulis*) in tidal estuary. *Water Res*; 42(12);3033-3046 pp.
- Keen, A. (1971). Sea shells of tropical west América. Marine mollusk form Baja California to Peru. Stanford University Press. Stanford, 1064
- Koneman, W. y S. Allen. 2006. Diagnósticos microbiológico texto y atlas en color. 6º Edición. Medica panamericana S.A. USA. 387 - 388 pp.
- Larrea, J; M. Rojas; B. Álvarez; N. Rojas y M. Heydrich. 2013. Bacterias indicadoras de contaminación fecal en la evaluación de la calidad de las aguas: revisión de la literatura. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*; 24-34 pp.
- Lazarich-Gener, R. 2009. Estudio de mercado de la concha negra (*Anadarasimilis* y *Anadara tuberculosa*) en Nicaragua. Comercialización con garantía de inocuidad. Recuperado de: <http://repositorio.uca.edu.ni/2702/>.

- Lee, R.; A. Lovatelli y A. Ababouch. 2010. Depuración de bivalvos: aspectos fundamentales y prácticos. FAO documentos técnico de pesca;511. Roma, FAO. 153pp.
- Leimbach, A.; J. Hacker y U. Dobrindt. 2013. E. coli as an All-Rounder: The Thin Line Between Commensalism and Pathogenicity. Springer, Berlín, Heidelberg; 358:3 – 32 pp.
- López, I.; I. Luna; A. Gutiérrez y J. Villalaz. 2005. Ciclo reproductivo de la almeja blanca (*Protohoca aspérrima*) (pelecypoda: verenidae) en la playa Bique, Arraiján. Rev. Tecnociencia; 7(1):43-53.
- Mclandsborough, L. 2005. Food Microbiolog Laboratory CRC Serie in Contemporary Food Science. CRC Press. 1° Edition. 33.
- Madigan, M.; J. Martinko; P. Dunlap y D. Clark. 2009. Brock. Biología de los microorganismos. 12° Edición. Pearson Educación, S.A. España. 1296 pp.
- Martínez, E., Moriñingo, D., Castro, M., Balebond, M., Muñoz, M., Borrego, J. 1992. Relationship between indicators of fecal pollution in shellfish-growing water and the occurrence of human pathogenic microorganisms in shellfish. J foodProt; 55(8):606-614.
- Martínez-Utarza J., Huapaya B., Gavilán R.G., Blanco- Abad V., Ansede-Bermejo J., Cadarso-Suarez C., Adolfo-Figueiras A., y Trinanés J. 2008. Emergence of asiatic Vibrio diseases in South America in phase with El niño. Epidemiology; 19(6):829-37.
- Ministerio de Salud (MINSA). 2014. Situación de Salud de Panamá. Obtenido de: <http://elsiglo.com/panama/hepatitis-afecta-panameños/23881454>.
- Montiel, A., E. Quiroga & D. Gerdes 2011. Diversity and spatial distribution patterns of *Polychaete assemblages* in the Paso Ancho, Straits of Magellan Chile. Continental ShelfResearch, 31: 304-314.
- MOSSEL, D.A. y MORENO, G.1985. Microbiología de Alimentos. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 135 pp.
- Morales, M.; J. Pérez; M. Rodríguez y M. Zárate. 2010. Microbiología del agua en la salud e importancia en el ambiente. Instituto Tecnológico Superior. 31 pp.

- Motarjemi, Y. y M. Adams. 2006. BrockEmergingfoodbornepathogens. 1° Edición. Woodhead Publishing. USA. 333-334 pp.
- Nair G.; T. Ramamurthy; S. Bhattacharya; B. Dutta y D. Sack. 2007. Global dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* serotype O3:K6 and its serovariants. *Clin Microbiol Rev*; 20(1):39–48.
- Narváez, A. 2003. *E. coli*, especies de *Vibrio* enteropatógeno y *Listeriamonocytogenes* en los moluscos bivalvos, mejillón y pepitona, extraídos de los bancos naturales Guaca y Chacopata del Estado Sucre. Trabajo Especial de Grado. Facultad Experimental de Ciencias. Universidad del Zulia, Venezuela 75 pp.
- NSSP 2009. National Shellfish Sanitation Program Guide for the Control of Molluscan Shellfish. Food and Drug Administration website. From the U.S. 180 pp.
- Neufeld, N. 1984. Procedures for the bacteriological examination of seawater and shellfish. In: Greenberg, A.E. and D.A. Hunt (eds). 1984. Laboratory Procedures for the Examination of Seawater and Shellfish, 5th ed. American Public Health Association. Washington, DC.
- Okoh L. 2008. Spatiotemporal dynamics of bacterial populations in the anoxic cariaco Basin. *Limnol Oceanogr*. 1574-6941.2011. 01116.x Source: PubMed.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). 2007. *E. coli*. Aspecto microbiológico. 1-6 pp.
- Organización Panamericana de la Salud (OPS). 2016. Guía para la calidad del Agua volumen 2: Aspectos Microbiológicos. 3-38 pp.
- Organización de las Naciones Unidas para La Alimentación y la Agricultura (ONUAA) FAO (Food and Agriculture Organization). 2011. Erradicación mundial de la peste bovina. Empresa. 240 pp.
- Ortíz, J. R. 2018. Diversidad y distribución de la comunidad de moluscos asociados al Humedal Las Lisas-Barrona en el Pacífico sur oriental de Guatemala. Como requisito para optar al grado académico de Maestro en Ciencias. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala - USAC Centro de Estudios del Mar y Acuicultura -CEMA.

- Páez, F. y C. Osuna. 2011. Biomonitores de la contaminación costera con referencia a las costas mexicanas: una revisión sobre los organismos utilizados. *Hidrobiológica*; 21(3):229 – 238 pp.
- Paredes, C., Cardoso, F., Santamaría, J., Esplana, J., y Llaja, L. 2016. Lista anotada de los bivalvos marinos del Perú. *Revista Peruana de Biología*. 23(2), 127-150 pp.
- Parthasarathy, S.; S. Das y A. Kumar. 2016. Occurrence of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in crustacean shellfishes in coastal parts of Eastern India. *Vet World*; 9(3):330-336.
- Pierson M. and L. Smoot L. 2001. Indicator Microorganisms and Microbiological Criteria. In: *Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers*. 2nd ed. Doyle M., L. Beuchat & T. Montville (eds.) ASM Press. USA. 71-87 pp.
- Ponte, H.R. y Prado, S.A. 2019. Estudio de calidad microbiológico del agua en coliformes totales y termotolerantes de los ríos de Cajamarca. Tesis de Ingeniera Ambiental. Universidad Privada del Norte en Perú. 55 pp.
- Programa mexicano de sanidad de moluscos bivalvos (PMSMB). 2008. Guía técnica para el control sanitario de moluscos bivalvos. México. 149 pp.
- Programa Mexicano de Sanidad de Moluscos (PMSMB). 2012. Requisitos Mínimos para la elaboración de los reportes del estudio sanitario inicial, anual y trienal de áreas de cosecha de moluscos bivalvos. México. 13 pp.
- Pullido, M., L. Ávila, S. Estupiñán y A. Gomez. 2005. indicadores microbiológicos de contaminación de las fuentes de agua. ISSN: 1794-2470 3(4).
- Quiñones Ramírez E.; C. Vásquez-Salina; F. Pedroche; L. Moreno-Sepúlveda y R. Rodas-Suarez. 2000. Presencia de los géneros *Vibrio* y *Salmonella* y detección de coliformes fecales en almejas del Golfo de México. *Hidrobiológica*; 10 (2):131-138.
- Rojas M. y C. Espinosa. 2015. Contaminantes químicos en agua y aire en Venezuela (2006-2013). *Salus*; 19 (2):44-52.
- Rowe Magnus D.; Z. Mohamed y D. Mazel. 2006. The adaptive genetic arsenal of pathogenic vibrio species: the role of integrons. In: Fabiano LT, A

- Brian & JG Swings (eds). The biology of vibrios, pp. 95 - 111. ASM Press, Washington.
- Saldaña, B.; A. Velásquez y I. Lorenzo. 2006. Determinación de la calidad microbiológica de las zonas de producción de los bivalvos *Donax punctatostriatus*, *Protothaca asperrima* y *Anadara tuberculosa* en Panamá. Tesis Licenciatura. Universidad de Panamá 2006.
- Sandoval, E. y A. Saborío. 2008. Calidad bacteriológica del agua en los sitios de recolección de "Concha negra" (*Anadara tuberculosa* y *Anadara similis*) en Chinandega, Nicaragua. Encuentro; 81:30-47.
- Sarcos, M., y Botero, L. 2005. Calidad microbiológica de la almeja *Polymesoda solida* recolectada en playas del Municipio Miranda del Estado Zulia. Venezuela: Universidad de Zulia.
- Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura (SERNAPESCA). 2018. Programa de Sanidad de Moluscos Bivalvos. Norma Técnica Sección 1. Clasificación y monitoreo de las Áreas de Extracción de Moluscos Bivalvos Estados Unidos. Departamento de Sanidad Pesquera. Chile.
- Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). 2003. Manual de Buenas Prácticas de Producción Acuícola de Molusco Bivalvos para la Inocuidad alimentaria. 1° Edición. México. 15 pp.
- Smithsonian Environmental Research Center. 2013. from the Field: A Warm Welcome in Bique.
- Streitenberger, M. y M. Baldini. 2016. Aporte de los afluentes a la contaminación fecal del estuario de Bahía Blanca, Argentina. Revista Internacional de Contaminación Ambiental. 243 - 248.
- Su Y.C. y Liu C. 2007. *Vibrio parahaemolyticus*: a concern of seafood safety. FoodMicrobiol; 24:549-558.
- Tantillo G., Fontanarosa M., Di Pinto A., y Musti M. 2004. Update perspectives on emerging vibrios associated with human infections. LettApplMicrobiol; 39:117-26.

- Vadillo Machota, S.; S. Piriz Duran y E. Mateos Yanes. 2002. Manual de microbiología veterinaria. 1° Edición. McGraw – Hill / Interamericana de España, S.A. 304 pp.
- Velázquez Roman J; N. León Sicairos; L. De Jesús Hernández Díaz y A. Canizalez Roman. 2014. Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 on the American continent. *Front Cell Infect Microbiol*;3(1):1–14.
- Wade, B.A. 1968. Studies on the biology of the West Indian beach clam, *Donax denticulatus* Linné, Life History. *Bull Mar Sci*; 18(1):876–901. Santiago- Chile.
- Yeung PS, Hayes MC, DePaola A, Kaysner CA, Kornstein L, Boor KJ. 2002. Comparative phenotypic, molecular, and virulence characterization of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 isolates. *Applied and Environmental Microbiology*. 68:2901-2909.
- Zuykov, M.; E. Pelletier y D. Harper. 2013. Bivalve mollusks in metal pollution studies: From bioaccumulation to biomonitoring. *Chemosphere*; 93(2):201–208.
- Zúñiga Carrasco, I. y J. Caro Lozano. 2014. *Vibriovulnificus* una bacteria al acecho en las playas. *RevEnfInfPed*; 27(110):532 – 534 pp.

# **ANEXOS**

**Cuadro 1.** Ubicaciones y Coordenadas de las zonas de muestreo.

Ubicación	Coordenada
Zona 1. Bique	8°52'35" N 79° 39'38" O
Zona 2. Chame	8°38'00.0" N 79° 47'00.0" O
Zona 3. Chepo	8°58'59.88" N 79° 1'59.88" O

**Cuadro 2.** Dimensiones de *A. tuberculosa*.

Meses de muestreos	Peso completo		Peso de concha		Tamaño			
	Grande (g)	Pequeña (g)	Grande (g)	Pequeña (g)	Grande		Pequeña	
					Ancho (mm)	Alto (mm)	Ancho (mm)	Alto (mm)
SEP.	143.5	48	48.7	11.3	73.48	54.33	42.54	36.78
OCT.	57	38	36	20	54.9	41.08	44.5	33.58
NOV.	34.1	14.9	23	8	47.79	36.81	35.86	27.21

**Cuadro 3.** Dimensiones de *L. aspérrima*.

Meses de muestreos	Peso completo		Peso de concha		Tamaño			
	Grande (g)	Pequeña (g)	Grande (g)	Pequeña (g)	Grande		Pequeña	
					Ancho (mm)	Alto (mm)	Ancho (mm)	Alto (mm)
SEP.	26	5	16	2	44.47	38.33	22.35	22.05
OCT.	20	3	14	2	36.01	32.95	21.84	18.74
NOV.	27	4	13	2.2	38.71	33.39	19.58	17.89



**Cuadro 4.** Dimensiones de *D. punctatostratus*.

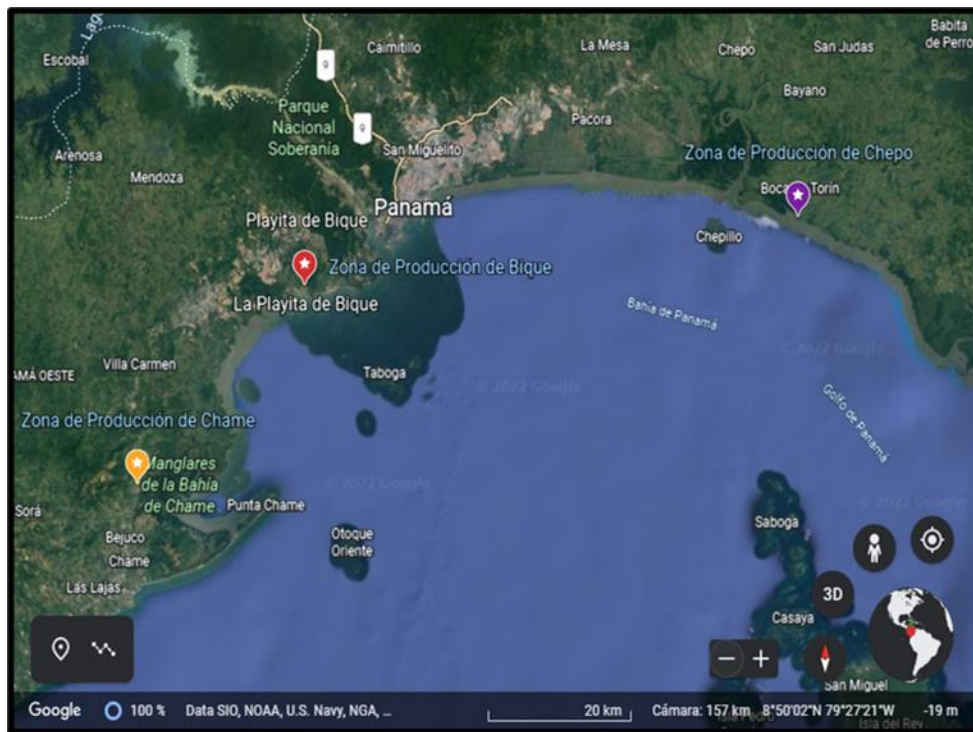
Meses de muestreos	Peso completo		Peso de concha		Tamaño			
	Grande (g)	Pequeña (g)	Grande (g)	Pequeña (g)	Grande		Pequeña	
					Ancho (mm)	Alto (mm)	Ancho (mm)	Alto (mm)
SEP.	26	5	16	2	44.47	38.33	22.35	22.05
OCT.	20	3	14	2	36.01	32.95	21.84	18.74
NOV.	27	4	13	2.2	38.71	33.39	19.58	17.89

**Cuadro 5.** Categoría de la zona producción la densidad de indicadores microbiológicos por especies de almejas.

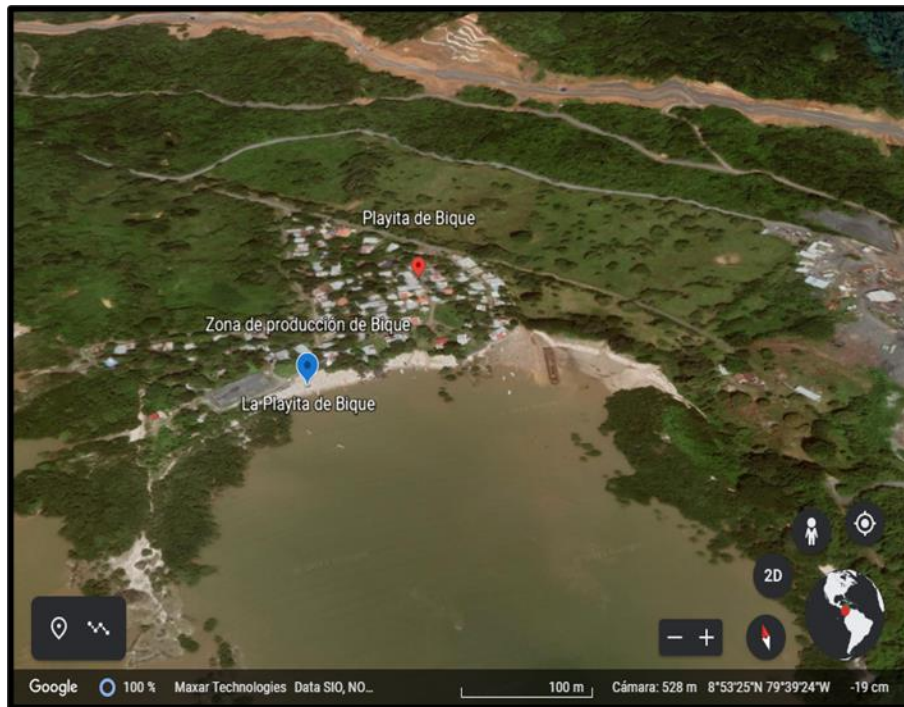
INDICADORES MICROBIOLÓGICOS	CATEGORÍAS DE LA NORMA TÉCNICA DE LA UNIÓN EUROPEA (NMP/100 gr)			MEDIAS GEOMÉTRICAS DE LA DENSIDAD DE INDICADORES MICROBIOLÓGICOS POR ESPECIE DE ALMEJA (NMP / 100 gr)			VALOR DE <i>p</i>
	A	B	C	<i>L. asperrima</i>	<i>D. punctatostratus</i>	<i>A. tuberculosa</i>	
Coliformes termotolerantes	≤ 300	≤ 6000	≤ 60000	<b>1893</b>	<b>790</b>	<b>163</b>	<b>0.015</b>
<i>E. coli</i>	≤ 230	≤ 4600	≤ 46000	<b>697</b>	<b>83</b>	<b>60</b>	<b>0.324</b>
<b>ZONA DE PRODUCCIÓN</b>				Playa Bique	Chepo	Chame	
<b>CATEGORÍA DE LA ZONA DE PRODUCCIÓN</b>				<b>B</b>	<b>B/A</b>	<b>A</b>	

**Cuadro 6.** Categoría de la zona producción la densidad de indicadores microbiológicos por mes de muestreo.

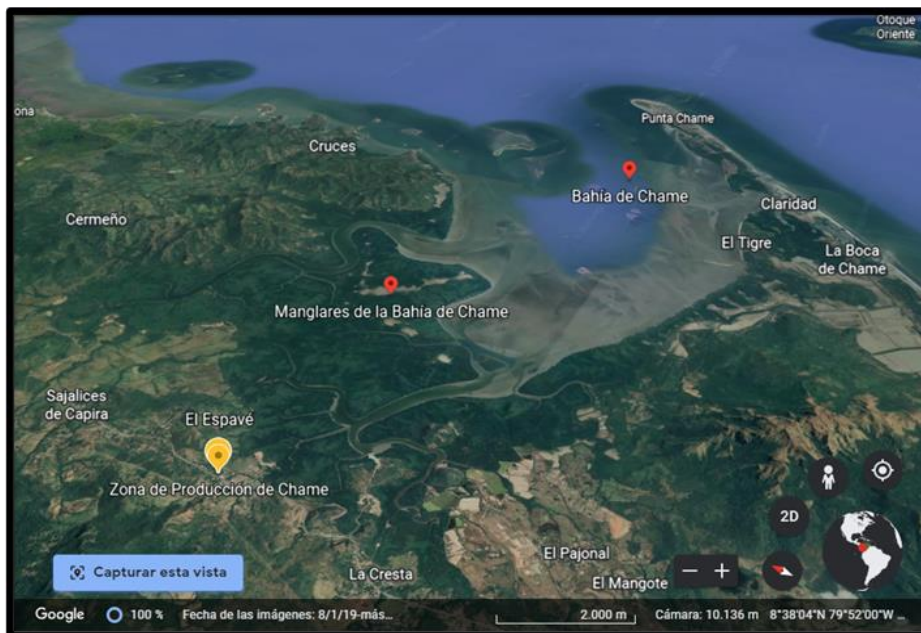
INDICADORES MICROBIOLÓGICOS	CATEGORIA DE LA NORMA TECNICA DE LA UNION EUROPEA (NMP/100 gr.)			MEDIDAS GEOMETRICAS DE LA DENSIDAD DE INDICADORES MICROBIOLÓGICOS POR MES DE MUESTREO (NMP/100gr)			VALOR DE p
	A	B	C	SEPTIEMBRE	OCTUBRE	NOVIEMBRE	
<i>Coliforme termotolerante</i>	≤ 300	≤ 6000	≤ 60000	243	1763	840	0.842
<i>E. coli</i>	≤ 230	≤ 4600	≤ 46000	53	683	103	0.766
<b>CATEGORIA DE LA FECHA DE COLECTA</b>				<b>A</b>	<b>B</b>	<b>B/A</b>	



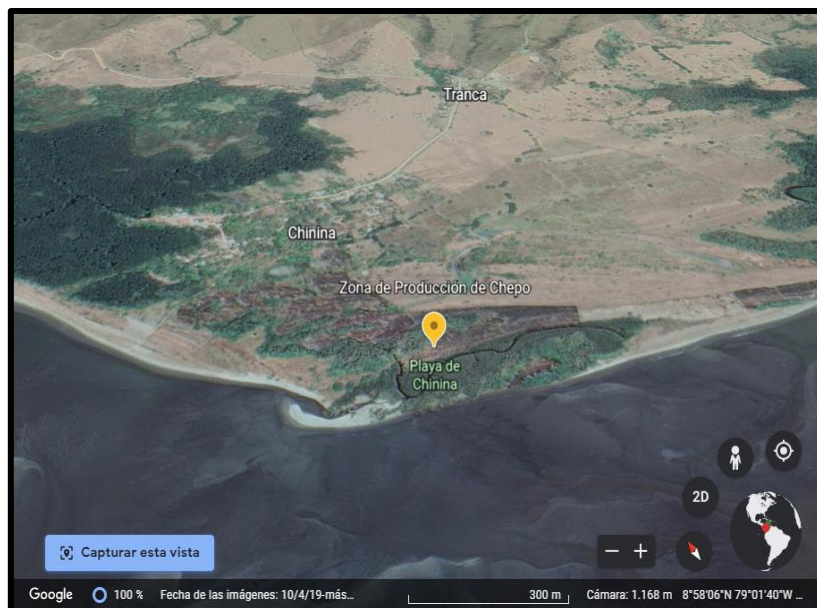
**Figura 1.** Mapa de la zona de producción Playita Bique, El Esparvado y Playa Chinina.



**Figura 2.**Vista satelital de la zona de producción de Bique



**Figura 3.**vista satelital de la zona de producción de Chame



**Figura 4.** Vista satelital de la zona de producción de Chepo.

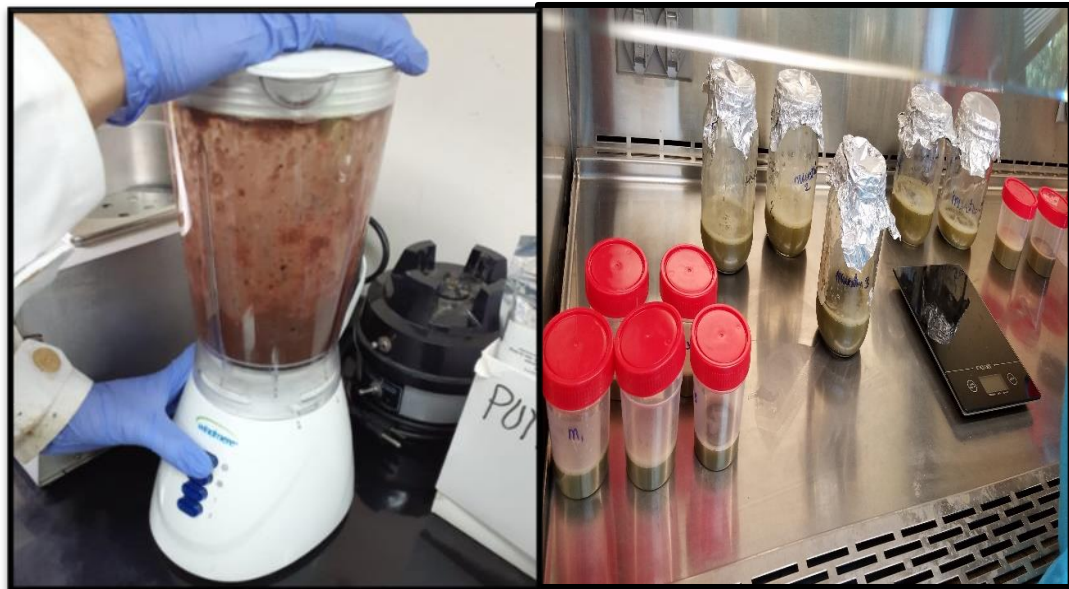


**Figura 5.** Especie de bivalvos colectadas: (A) *A. tuberculosa*, (B) *L. aspérrima* y (C) *D. punctatostriatus*.

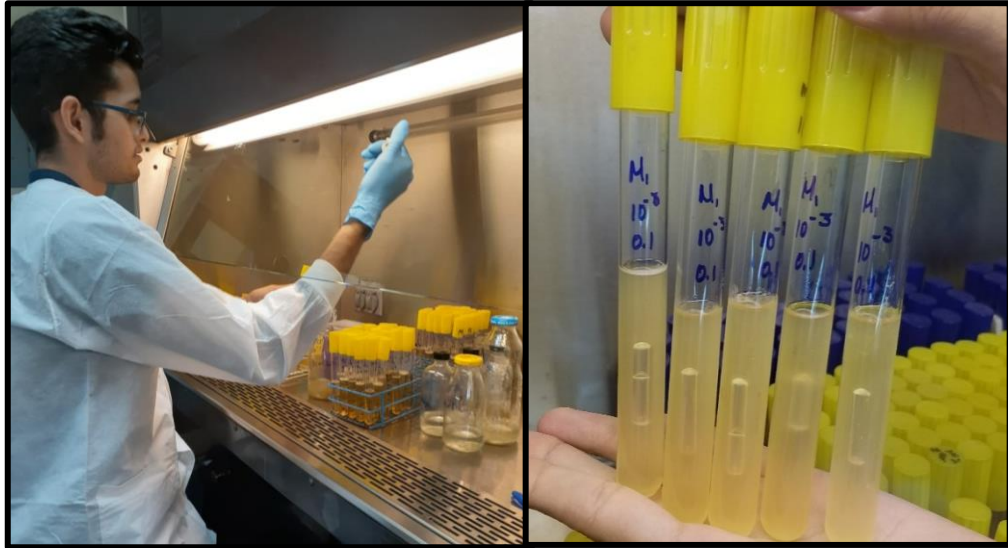




**Figura 6.** Lavado superficial, extracción del cuerpo y líquido intervalvar de las tres especies de bivalvos.



**Figura 7.** Licuado del líquido intervalvar con tampón fosfato y pesaje de la muestra.



**Figura 8.** Dilución seriada para la muestra y prueba presuntiva que dieron positivo durante 48 h en la incubadora a 37°C.

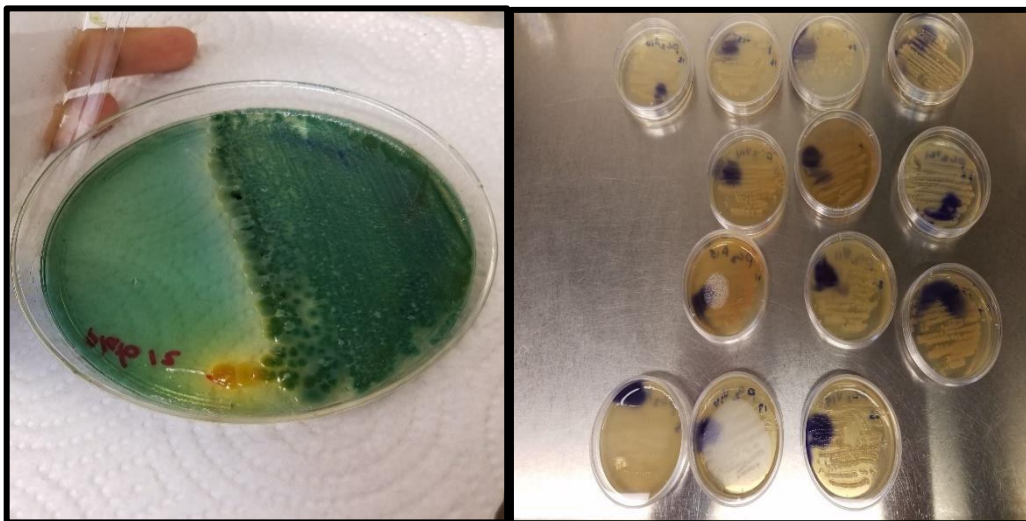


**Figura 9.** Traslado de los tubos positivos al medio EC-MUG. Prueba realizada para determinar las muestras positivas de coliformes termotolerantes y *E. coli* al exponer a la luz ultravioleta (fluorescencia).

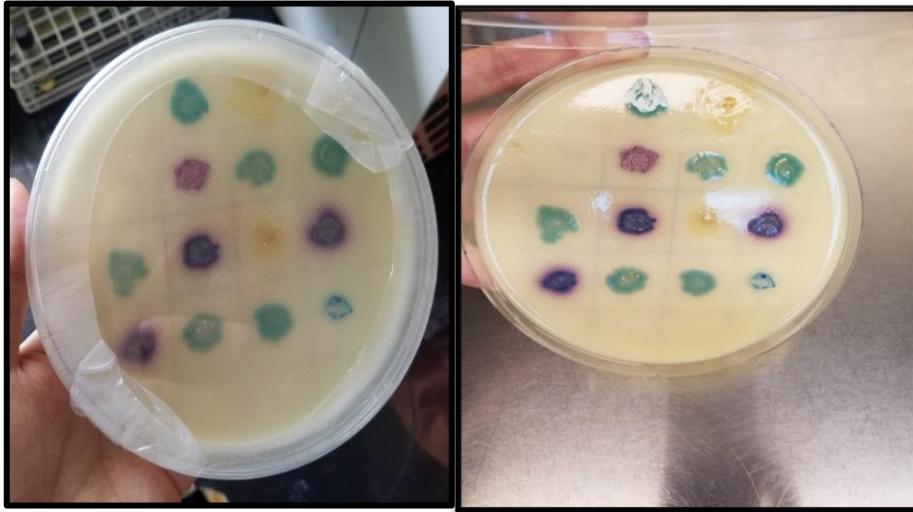




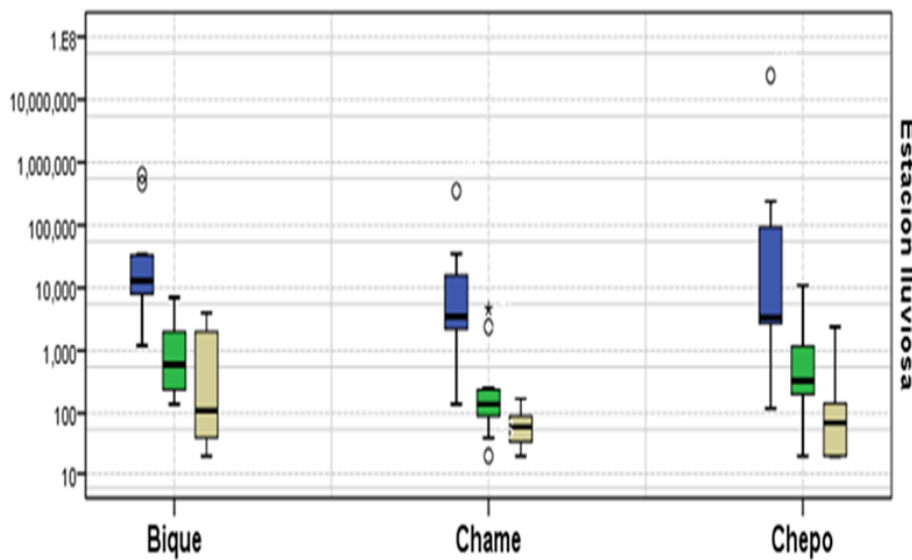
**Figura 10.** Dilución seriada para *Vibrio* spp. y técnica de estricción de los tubos positivos.



**Figura11.** Prueba confirmada de Vibriospor medio TBSC y se considera positivo aquellos platos que dieron color violeta con la prueba de la catalasa.

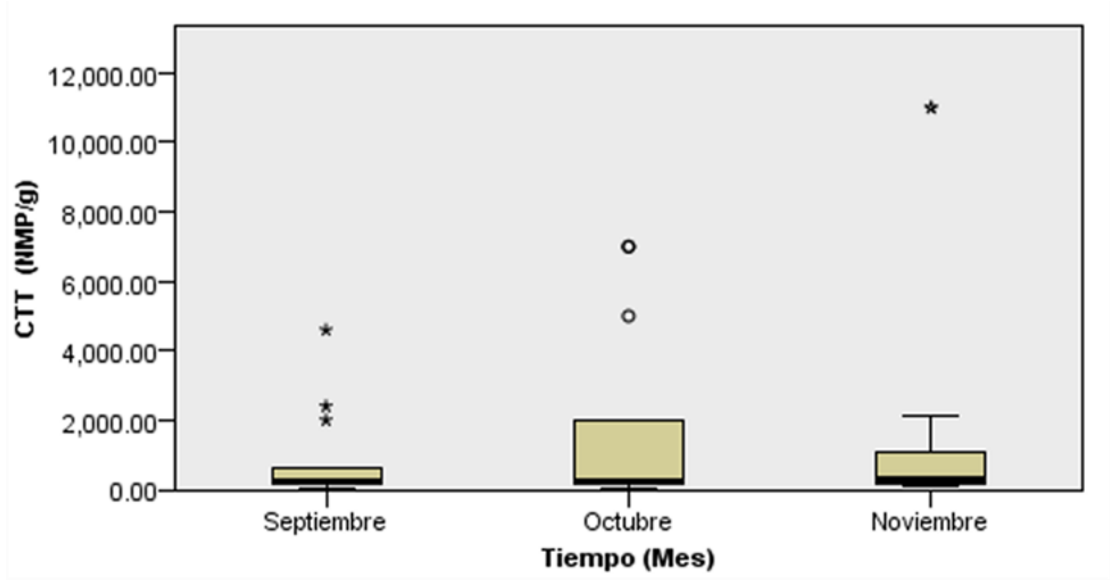


**Figura 12.** Prueba confirmada para colonia de *Vibrio* spp. con medio Hardy Chrome.

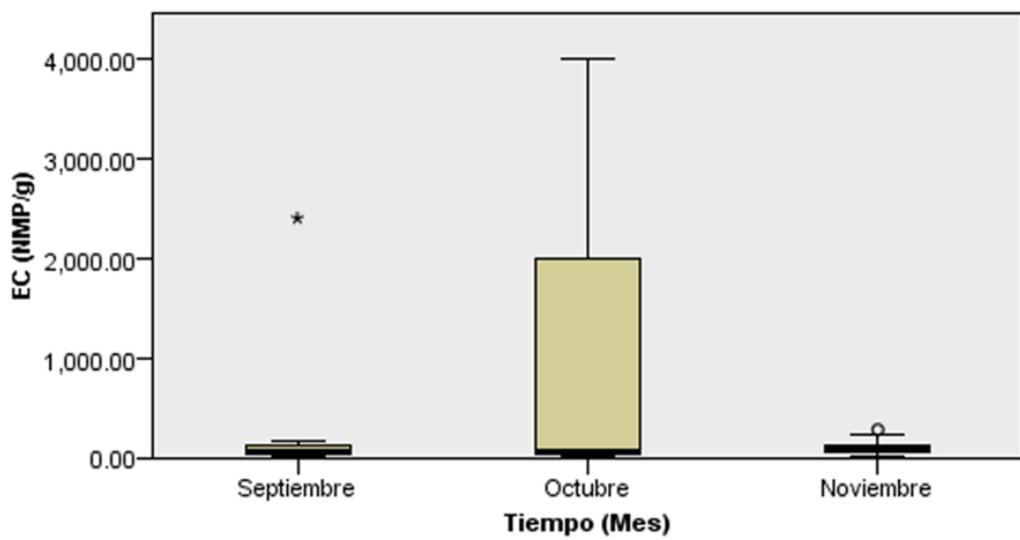


**Figura 13.** Diagrama de cajas de los microorganismos: coliformes totales (CT), coliformes termotolerantes (CTT) y la *E. coli* (EC) en NMP/g en los sitios Bique, Chame y Chepo durante la estación lluviosa.

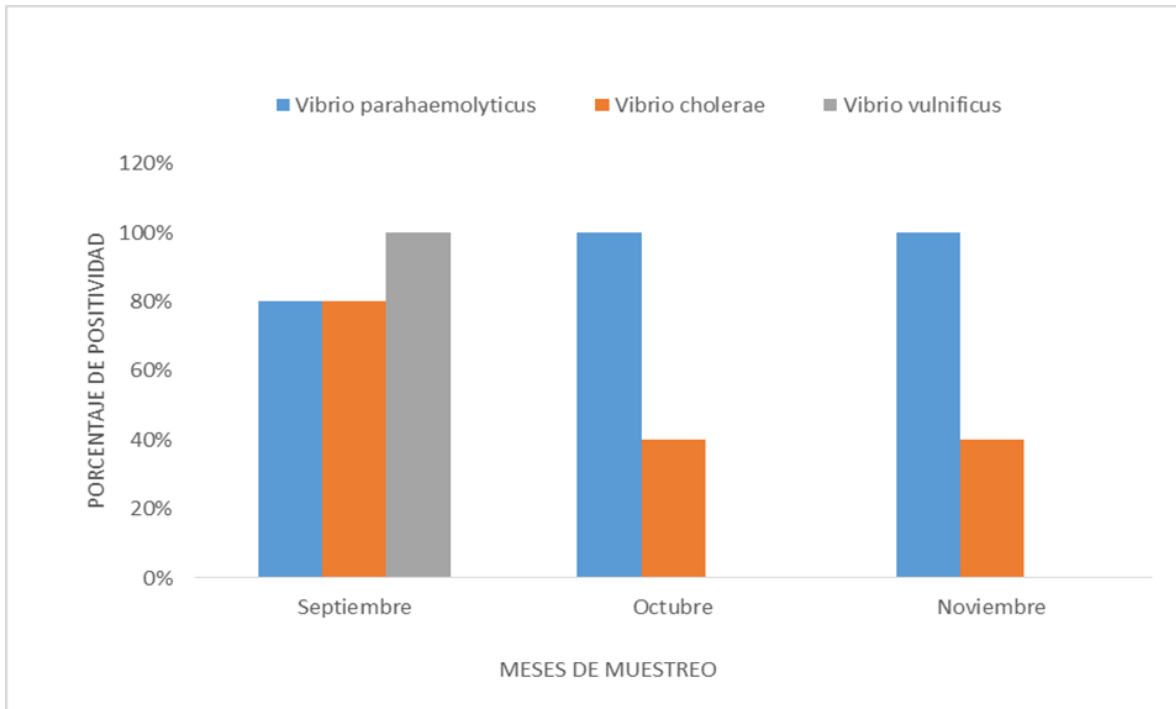




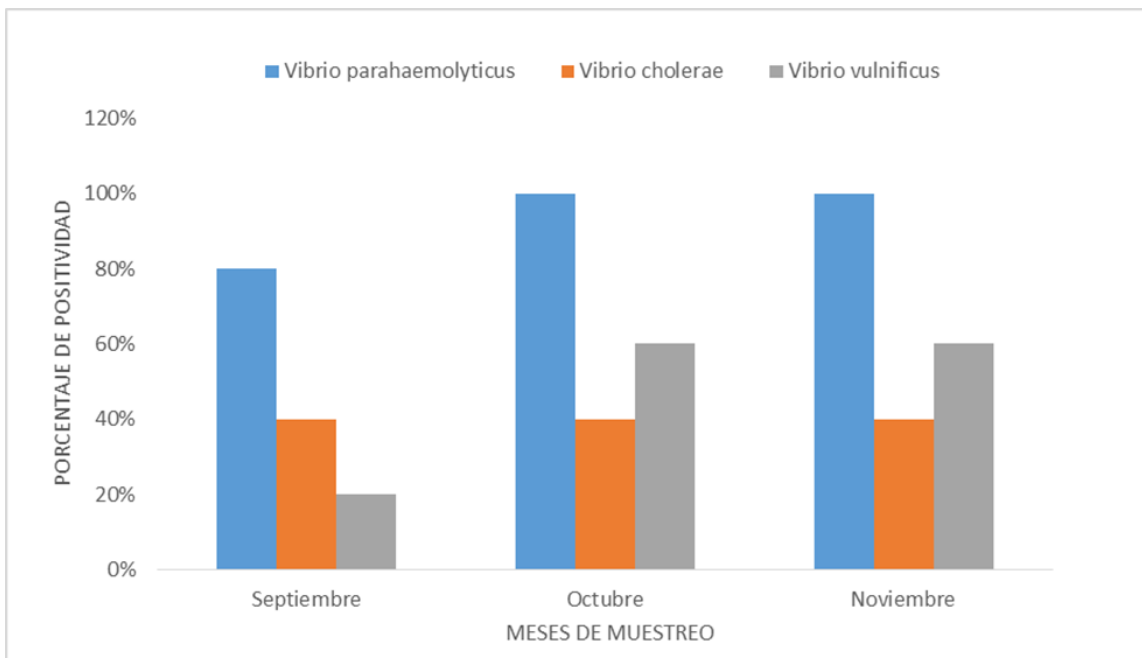
**Figura 14.** Diagrama de caja en relación a los meses de muestreo para coliformes termotolerante.



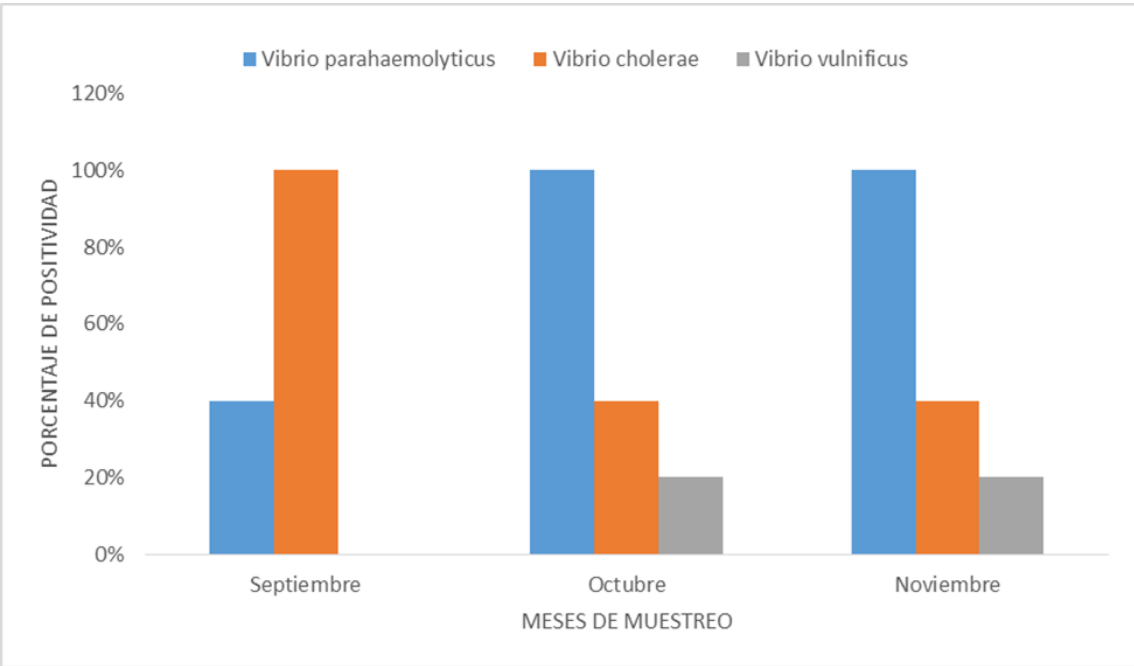
**Figura 15.** Diagrama de caja en relación con los meses de muestreo para *E. coli*



**Figura 16.** Porcentaje de positividad de *Vibrio* sp. en la zona de productividad de Chame



**Figura 17.** Porcentaje de positividad *Vibrio* sp. en la zona de productividad de Bique.



**Figura 18.** Porcentaje de positividad de *Vibrio* sp. en la zona de productividad de Chepo.