



UNIVERSIDAD DE PANAMÁ.
Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología.
Escuela de Biología.

**DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LAS ZONAS DE
PRODUCCIÓN DE LOS BIVALVOS *DONAX PUNCTATOSTRIATUS*,
PROTOHACA ASPERRIMA Y *ANADARA TUBERCULOSA* EN PANAMÁ**

Presentado Por:

Lianeth E. Garrido R.

Anine O. Robinson K.

Nuvia E. Sánchez M.

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

2018

DEDICATORIAS

Dedico este trabajo principalmente a Dios por haberme acompañado y guiado durante todo mi camino, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad. A mis padres Enrique Garrido y Daysi Rodríguez por apoyarme en todo momento, por los valores que me han inculcado y por haberme dado una excelente educación en el transcurso de mi vida. A mis hermanos por ser parte importante de mi vida. A mi novio Ricardo, por acompañarme durante todo este arduo camino y compartir conmigo alegrías y fracasos. A todos muchas gracias y que Dios los bendiga y guarde siempre.

Lianeth Garrido Rodríguez.

Este trabajo va especialmente dedicado a Dios primeramente por darme toda la sabiduría que me brindo, a mi abuela Florence Fletcher Aikman quien me ayudó mucho para que esto fuera posible, aunque en presencia física no esté siempre la recordare también va dirigido a mis padres Adelina Kerr y Guillermo Robinson son las personas que con valores, consejos y amor me enseñaron a saber conquistar mis metas. Al igual se lo dedico a mi amado Esposo, a mi hermano, al resto de mis familiares y profesores que formaron parte de esto, dándoles las Gracias a todos y que mi Dios Todopoderoso los llene de Bendiciones.

Anine Robinson Kerr

Mi tesis se la dedico en primer lugar a Diosito por darme la oportunidad de llegar hasta donde estoy, a mis padres Judith Madrid y Arístides Sánchez por brindarme su apoyo incondicional, por confiar siempre en mí, por sus sacrificios, por su amor, paciencia y consejos para poder cumplir la primera de mis metas, a mis hermanas por estar siempre a mi lado, a mi sobrina Michelle por darme la inspiración para seguir esforzándome, a todos los profesores del presente y pasado que hicieron parte de mi formación académica, y a todas las demás personas que durante todos estos años estuvieron a mi lado apoyándome y que lograron que este sueño se hiciera realidad. A todos muchas gracias y que Diosito me los bendiga siempre.

Nuvia Sánchez Madrid

AGRADECIMIENTO

Le agradecemos primeramente a nuestro Padre Celestial por habernos ayudado a culminar una meta más en nuestras vidas

Al Laboratorio de Microbiología Experimental y Aplicada (LAMEXA) y al Laboratorio de Microbiología de Aguas (LAMA) de la Vicerrectoría de Investigación y Postgrado donde realizamos todo el trabajo con el apoyo de su equipo y espacio físico.

A nuestros Profesores asesores: Fermín Mejía, Humberto Cornejo y Alex O. Martínez, por el apoyo, los consejos y tiempo que nos brindaron durante el desarrollo de nuestro trabajo de graduación.

Agradecidas estamos Infinitamente con las personas que nos colaboraron en cada uno de los tres puntos de muestreo con la búsqueda de las Almejas nuevamente Gracias tanto al Prof. Fermín Mejía como a los estudiantes Jairo Dakota y Mayte por el apoyo cada mes en la búsqueda de muestras.

Por último estamos inmensamente agradecidas con nuestros padres por su apoyo incondicional para con nosotras por siempre brindarnos todo lo que necesitábamos además del amor tan grande que siempre nos brindan, mil gracias para ustedes. También agradecidas con nuestras amistades, compañeros y con todas las personas que de alguna u otro forma ayudaron con la culminación de este trabajo.

Lianeth, Anine y Nuvia

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	III
AGRADECIMIENTO.....	V
ÍNDICE GENERAL.....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS.....	IX
RESUMEN.....	XII
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	4
CAPÍTULO I MARCO TEÓRICO.....	5
1.1 ASPECTOS GENERALES DE LOS MOLUSCOS BIVALVOS.....	6
1.1.2 <i>Donax punctatostriatus</i>	7
1.1.3 <i>Protothaca aspérrima</i>	8
1.1.4 <i>Anadara tuberculosa</i>	8
1.2 ALIMENTACIÓN.....	11
1.3 CONTAMINACIÓN.....	11
1.3.1 Contaminación por bacterias.....	12
1.3.2 Contaminación por virus.....	12
1.3.3 Contaminación por biotoxinas marinas.....	13
1.4 MICROORGANISMOS CAUSANTES DE ENFERMEDADES POR EL CONSUMO DE MOLUSCOS CONTAMINADOS.....	13
1.4.1 Coliformes.....	13
1.4.2 <i>Escherichia coli</i>	15
1.4.3 Enterococos.....	17
1.4.4 <i>Clostridium perfringens</i>	18
1.5 CLASIFICACIÓN DE LA ZONA DE PRODUCCIÓN SEGÚN SERNAPESCA (2015).....	20
1.6 MEDIDAS DE CONTROL.....	22
CAPÍTULO II MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
2.1. MATERIALES.....	26

2.1.1 Equipos de laboratorio.....	26
2.1.2 Cristalería	26
2.1.3 Medios de cultivos y reactivos.....	26
2.1.4 Otros materiales.....	26
2.2. METODOLOGÍA.....	27
2.2.1 Sitios de muestreos.....	27
2.2.2 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	28
2.2.3 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS	29
2.2.4 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO.....	30
2.2.4.1 Prueba Presuntiva.....	30
2.2.4.2 Coliformes termotolerantes	30
2.2.4.3 <i>Escherichia coli</i>	30
2.2.4.4 <i>Streptococcus</i> fecales	31
2.2.4.5 <i>Clostridium perfringens</i>	31
CAPÍTULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
3.1 RESULTADO	33
3.1.1 Zonas de producción	33
3.1.2 Meses de muestreos	34
3.2 DISCUSIÓN	36
CAPÍTULO IV CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	40
4.1 CONCLUSIONES	41
4.2 RECOMENDACIONES	43
BIBLIOGRAFÍA	44
APÉNDICES.....	49
ANEXO.....	51

ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS

FIGURA 1. Especies colectadas en diferentes zonas de producción	52
FIGURA 2. Extracción del cuerpo y líquido intervalvar de las tres especies bivalvas	52
FIGURA 3. Licuado de la muestra en buffer fosfato previamente esterilizado	53
FIGURA 4. Procesamiento de la muestra	53
FIGURA 5. Técnica de tubos múltiples para bacterias fermentadoras de lactosa	54
FIGURA 6. Prueba presuntiva para bacterias fermentadoras de lactosas	54
FIGURA 7. Tubos con medios EC MUG para cuantificar <i>Escherichia coli</i>	55
FIGURA 8. Técnica de tubos múltiples para estreptococos fecales.	55
FIGURA 9. Prueba confirmativa para estreptococos fecales	56
FIGURA 10. Inoculación de tubos con medio que contenían sulfato ferroso y leche entera.	56
FIGURA 11. Técnica de tubos múltiples para la determinación de la bacteria <i>Clostridium perfringens</i>	57
FIGURA 12. Técnica de estriación a inocular los tubos positivos	57
FIGURA 13. Prueba de confirmación para colonias de <i>Clostridium perfringens</i> en plato petri con medio SPS.....	58
FIGURA 14. Distribución de Coliformes termotolerantes según los meses de muestreos.....	59

FIGURA 15. Distribución de Coliformes termotolerantes según las zonas de producción.....	59
FIGURA 16. Distribución de <i>E. coli</i> según los meses de muestreo.	60
FIGURA 17. Distribución de <i>E. coli</i> según las zonas de producción.	60
FIGURA 18. Distribución de Estreptococos según los meses de muestreo.....	61
FIGURA 19. Distribución de Estreptococos según las zonas de producción.	61
FIGURA 20. Distribución <i>C. perfringens</i> según los meses de muestreo.....	62
FIGURA 21. Distribución de <i>C. perfringens</i> según las zonas de producción.	62
CUADRO 1. Categoría de la zona de producción según la densidad de indicadores... microbiológicos por especies de almejas	63
CUADRO 2. Categoría del mes de colecta según la densidad de indicadores microbiológicos.....	64

RESUMEN

Donax punctatostriatatus, *Protothaca asperrima* y *Anadara tuberculosa* son bivalvos de alto consumo nacional, por esto han sido seleccionadas para determinar la calidad microbiológica de las zonas donde fueron recolectados, tomando como parámetros de calidad microbiológica la población de coliformes termotolerantes, *Escherichia coli*, Estreptococos fecales y *Clostridium perfringens*. El muestreo se realizó en las tres zonas de producción durante las mareas bajas de los meses de agosto, septiembre y octubre. En cada mes se tomaron tres muestras de cada una de las tres zonas de producción que hicieron un total de 36 muestras, 12 muestras de cada especie. Cada muestra consistía de 100 gr de cuerpo y líquido intervalvar las cuales se mezclaban con 100 mL de buffer de fosfato (Canadian Shellfish Sanitation Program, 2010), previamente esterilizado y se licuaron obteniendo la dilución madre de la cual se partía para realizar los parámetros microbiológicos antes mencionados. Los datos obtenidos se compararon con la clasificación realizada en 2015 por SERNAPESCA para ubicar las zonas de producción en su correspondiente categoría los resultados determinaron la presencia de cuatro parámetros microbiológicos en las muestras de almejas de las tres zonas de producción. El primer parámetro fue el de coliformes termotolerantes, y presentó valores de 170,951.9 NMP/100g (Chinina), 64,356.2 NMP/100g (Playa Bique), y 14,162 NMP/100g (El Espavé), respectivamente. De acuerdo con este parámetro, los sitios de producción de Chinina y Bique están por debajo de la categoría C, mientras que El Espavé se ubica en categoría C. Al comparar las medias geométricas obtenidas por zona de producción para este parámetro, se observó que hay diferencias significativas entre los diferentes sitios de muestreo ($p= 0.006$). El siguiente parámetro determinado fue del indicador *Escherichia coli*, que presentó valores de 17,675.6 NMP/100g (Playa Bique), 1,549.1 NMP/100g (Chinina), y 0 NMP/100g (El Espavé), respectivamente. De acuerdo con este parámetro, el sitio de producción de playa Bique se ubica en categoría C; el sitio de Chinina, en categoría B, y El Espavé, en categoría A. Al comparar las medias geométricas obtenidas por zona de producción para este parámetro, se observó que, al igual que en el caso anterior, hay diferencias significativas entre los diferentes sitios de muestreo ($p= 0.001$). En cuanto al indicador *Clostridium perfringens*, este parámetro presentó valores de 57.3 NMP/100g (Playa Bique), 13.4 NMP/100g (Chinina), y 4.9 NMP/100g (El Espavé),

respectivamente. No se observó diferencias significativas para este indicador entre las zonas de producción ($p = 0.055$). El cuarto indicador utilizado como parámetro microbiológico para comparar las zonas de producción fue estreptococos este presentó valores de 2,038.2 NMP/100g (Playa Bique), 1,042.3 NMP/100g (Chinina), y 515.9 NMP/100g (El Espavé), respectivamente. Al comparar las medias geométricas obtenidas por zona de producción, se observó que no hay diferencias significativas entre los diferentes sitios de muestreo ($p = 0.304$).

Palabras claves: Bivalvos, Coliformes termotolerantes, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, Estreptococos fecales, calidad microbiológica.

SUMMARY

Donax punctatostriatus, *Protothaca asperrima* and *Anadara tuberculosa* are bivalves of high national consumption, for this reason they have been selected for the microbiological quality of the areas where they were collected, taking as parameters of microbiological quality the population of thermotolerant coliforms, *Escherichia coli*, Fecal streptococci and *Clostridium perfringens*. The sampling was carried out in the three production zones during the low tides of the months of August, September and October. In each month three samples were taken from each of the three production zones that made a total of 36 samples, 12 samples of each species. Each sample consisted of 100 gr of body and intervalvar liquid which were mixed with 100 mL of phosphate buffer (Canadian Shellfish Sanitation Program, 2010), previously sterilized and liquefied, obtaining the mother dilution from which it was started to perform the microbiological analyzes aforementioned. The data obtained were compared with the classification carried out in 2015 by SERNAPESCA to locate the production areas in their corresponding category. The results determined the presence of four microbiological parameters in the clam samples from the three production zones. The first parameter was that of thermotolerant coliforms and presented values of 170,951.9 MPN / 100g (Chinina), 64,356.2 MPN / 100g (Playa Bique), and 14,162 MPN / 100g (El Espavé), respectively. According to this parameter, the production sites of Chinina and Bique are below category C, while El Espavé is located in category C. When comparing the geometric means obtained by production area for this parameter, it was observed that there are significant differences between the different sampling sites ($p = 0.006$). The next parameter determined was the *Escherichia coli* indicator, which showed values of 17,675.6 NMP / 100g (Playa Bique), 1,549.1 NMP / 100g (Chinina), and 0 NMP / 100g (El Espavé), respectively. According to this parameter, the Bique beach production site is located in category C; the site of Chinina, in category B, and El Espavé, in category A. When comparing the geometric means obtained by production area for this parameter, it was observed that, as in the previous case, there are significant differences between the different sampling sites ($p = 0.001$). Regarding the indicator *Clostridium perfringens*, this parameter presented values of 57.3 NMP / 100g (Playa Bique), 13.4 NMP / 100g (Chinina), and 4.9 NMP / 100g (El Espavé),

respectively. No significant differences were observed for this indicator between production areas ($p = 0.055$).

The fourth indicator used as a microbiological parameter to compare the production areas was Streptococci. This presented values of 2,038.2 NMP / 100g (Playa Bique), 1,042.3 NMP / 100g (Chinina), and 515.9 NMP / 100g (El Espavé), respectively. When comparing the geometric means obtained by production area, it was observed that there are no significant differences between the different sampling sites ($p = 0.304$).

Keywords: Bivalves, thermotolerant coliforms, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, Fecal streptococci, microbiological quality.

INTRODUCCIÓN

Frecuentemente, las áreas costeras se encuentran contaminadas con microorganismos del tracto gastrointestinal del hombre, debido al crecimiento poblacional y a la insuficiencia de los procesos de tratamiento de las aguas residuales. Como consecuencia, se impacta el ambiente marino y la calidad microbiológica de los bivalvos (Muñoz *et al.*, 2008).

La materia orgánica que llega al agua suele poseer una contaminación elevada que procede de efluentes (aguas) urbanos, industriales, agrícolas o ganaderos que se liberan al medio con una elevada contaminación. Estos contaminantes del agua, son principalmente de tipo microbiano, pero también de tipo químico, y dependiendo de la contaminación del agua de cultivo, estos llegan al tubo digestivo de los animales acumulándose en sus tejidos. Si los animales sobreviven a las infecciones por microorganismos o a los químicos tóxicos, acumulan los microorganismos o los tóxicos que posteriormente se transmitirán a los consumidores (Rodríguez, 2003).

Los contaminantes que concentran los moluscos bivalvos pueden provocar toxiinfecciones en las personas que los consumen. En el caso de los contaminantes microbianos, el peligro se ve potenciado además porque a menudo muchas especies se consumen crudas o poco cocinadas, lo que convierte a los moluscos bivalvos en una categoría de alimento de alto riesgo que requiere medidas de control adecuadas (Elika, 2012).

El impacto de la población sobre los sistemas ecológicos del planeta se ha ido haciendo más aparente en los últimos años, poniendo de manifiesto la estrecha

relación existente entre los niveles de contaminación ambiental y la salud de la población. Las enfermedades infecciosas representan un gran riesgo y son la principal causa de muerte en niños, adultos y jóvenes. Y esto según información facilitada por la Organización Mundial de la Salud (OMS), considerando únicamente las enfermedades diarreicas frecuentemente asociadas al consumo de agua o alimentos contaminados (Bofill *et al.*, 2005).

Es de interés para la salud pública que se determine parámetros higiénico-sanitario que establezcan la calidad de las zonas de producción de los bivalvos *Donax punctatostriatus*, *Protothaca asperrima* y *Anadara tuberculosa*, colectadas en Chinina, Playa Bique y El Espave, respectivamente. A través de parámetros como las bacterias indicadoras: coliformes fecales, *Escherichia coli* y *Clostridium perfringens* podremos proporcionar información que contribuirá a la conservación de las zonas de producción de bivalvos, ya que son organismos muy sensibles a la contaminación. El riesgo de no tomar medidas de conservación en las zonas de producción trae consigo pérdidas económicas tanto al país como a los pescadores que utilizan estos bivalvos como fuente importante de ingresos. Con el propósito de realizar dicha investigación decidimos determinar la calidad higiénico-sanitaria de las zonas de producción de los bivalvos *Donax punctatostriatus*, *Protothaca asperrima* y *Anadara tuberculosa* (Saldaña *et al.*, 2006).

Objetivos

Objetivo General

Evaluar la calidad microbiológica de los bivalvos *D. punctatostriatus*, *P. asperrima* y *A. tuberculosa* en tres zonas de producción en Panamá.

Objetivos específicos:

Establecer el número más probable (NMP) de coliformes fecales mediante la técnica de tubos múltiples.

Determinar la carga de *E. coli* mediante tubos múltiples con caldo EC MUG.

Determinar NMP de *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*) mediante tubos múltiples con leche ferrosa y agar SPS.

Determinar la carga de estreptococos fecales mediante caldo azida dextrosa, utilizando la técnica de tubos múltiples.

Clasificar las zonas de producción a estudiar de acuerdo a las categorías de la Unión Europea.

CAPÍTULO I
MARCO TEÓRICO

1.1 Aspectos generales de los Moluscos Bivalvos

La clase Bivalvia constituye un grupo dentro de los moluscos, conocidos anteriormente como lamelobranquios o pelecípodos. Consta de unas 13 000 especies que viven en agua dulce y mayoritariamente en agua salada, caracterizadas por tener un cuerpo comprimido lateralmente y contenido en una concha formada por dos valvas unidas por una bisagra. Tiene una gran importancia en la alimentación humana y dentro de los bivalvos encontramos algunos moluscos muy conocidos como pueden ser las ostras, los mejillones, las navajas, los berberechos y las almejas (Gil, 2016).

La principal característica de los bivalvos es la presencia de dos valvas articuladas dorsalmente que encierra por completo el cuerpo. El cuerpo también se encuentra dorsalmente comprimido y las branquias son de gran tamaño ya que tienen la función de capturar el alimento a través de filtración de agua y al mismo tiempo son los órganos respiratorios del animal (Castilla, 2007).

El carácter distintivo de las conchas de los bivalvos es la presencia de 2 valvas calcificadas, unidas sobre la línea media dorsal por un ligamento flexible que forma el istmo con escaso carbonato de calcio y gran cantidad de proteínas. 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 comprensión lateral y elongación dorsoventral. La forma de la concha de los bivalvos está relacionada con las actividades propias del animal.

Las ostras, organismos sésiles carecen de mecanismos de locomoción una vez fijadas al sustrato (Castilla, 2007).

Presentan factores que determinan una amplia gama de características plásticas y variables en la forma y a veces en el tamaño, relacionadas con el tipo de vida de un organismo adherido a un sustrato duro. Su forma, por consiguiente, está determinada por sus hábitos de vida sedentaria, pero principalmente por razones filogenéticas y funcionales. Los bivalvos sésiles tienden a presentar márgenes redondeados con formas cilíndricas, cónicas o globulares tendiendo a desarrollar órganos dispuestos más o menos radialmente y a presentar una consistencia comparativamente gruesa, así como un mayor tamaño ya que estos factores a diferencia de los bivalvos móviles no afectan básicamente la forma de vida de la ostra. Se determina que la forma de la concha llamada el umbo está compuesta por una serie de arcos, que corresponden a la curvatura formada por espirales logarítmico que es un parámetro para determinar el origen común (Menéndez, 1998).

1.1.2 *Donax punctatostriatus*

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 (García *et al.*, 2003).

1.1.3 *Protothaca aspérrima*

La almeja blanca, *P. aspérrima*, representa un producto marino muy apetecido por la población panameña. Para muchas poblaciones humanas costeras, ella constituye una fuente importante de proteína en su dieta; representando, asimismo, una forma de ingreso económico para dichos hogares, ya que este producto es muy cotizado en los restaurantes. Este bivalvo prefiere playas con un sustrato arenoso fangoso con mucha materia orgánica. Varias son las playas en nuestro país con las condiciones adecuadas para su desarrollo. Entre éstas tenemos: Puerto Caimito, Bique, Punta Chame, en la provincia de Panamá; Garachiné y Taimití en la provincia de Darién, y Farallón en la provincia de Coclé. En los dos primeros lugares es donde se extrae este molusco; sin embargo, es Bique en donde esta actividad es mayor, supliendo los requerimientos de este bivalvo en la ciudad de Panamá (López *et al.*, 1998). Los estudios de López *et al.*, (1998) sugieren que su período de desove es en los meses de enero y octubre, lo cual debe ser confirmado.

1.1.4 *Anadara tuberculosa*

A. tuberculosa es conocida comúnmente como concha negra o concha prieta en Panamá. Es un organismo que alcanza una talla promedio de 62 mm de altura por 49

mm de longitud; es típico de la zona de mareas, y alcanza su máxima densidad en las raíces de mangle. El intervalo de temperaturas en las zonas donde se desarrolla se encuentra entre los 17° C y los 27°C y en mangles pantanosos desde los 20.5°C a 35°C. En cuanto a la salinidad, los límites están entre los 30-40‰ para una población de mangles localizados en el Mogote, de la Bahía de la Paz Baja California Sur (Baqueiro *et al.*, 1982).

La *A. tuberculosa*, son moluscos bivalvos que se encuentran asociados a las raíces del mangle, especialmente *Rhizophora spp.*, en el Pacífico Americano (Fischer *et al.*, 1995). Según Campos (1988), *A. tuberculosa* tiene una tasa de crecimiento rápido alcanzando su talla comercial de 18 a 24 meses, por tanto, puede producir potencialmente una cantidad considerable de biomasa en corto tiempo. Esta característica le confiere a esta especie un gran potencial para ofrecer una alta producción sostenida (natural o como producto de cultivo) bajo un esquema adecuado de manejo.

Las observaciones de Campos (1988), indican que, en las costas del Pacífico Americano, la *A. tuberculosa* es explotada desde el nivel de subsistencia básica hasta la comercialización. Esta última faceta de su explotación ha intensificado en gran medida la presión de extracción que se da de las poblaciones en bancos donde el molusco habita en forma natural (Campos, 1988). Estas aseveraciones son válidas prácticamente para todo el sector pacífico. El INRENARE/ OIMT (1995b), reporta que las actividades de explotación de *A. tuberculosa* en Panamá, se realizan desde el nivel de extracción de subsistencia hasta el comercial y que dichas

actividades representan uno de los mayores ingresos del país y para algunas familias el único ingreso.

Los datos de los niveles de exportación de los años 1989 a 1991, muestran una disminución del porcentaje de exportación anual de 648.4 Kg (1989), a 263.9 Kg (1991), (Maturrell *et al.*, 1992). En este mismo contexto el MICI (1997), indica que la actividad pesquera de *A. tuberculosa* se caracteriza por una falta de planificación, que ha puesto en riesgo la estabilidad, persistencia y productividad de la especie y que el crecimiento demográfico, ha implicado un incremento en el número de concheros, lo que se traduce en una mayor presión del recurso (MICI, 1997).

Adicionalmente, la degradación de los manglares del sector Pacífico en los últimos años, ha causado un daño ecológico del hábitat natural de la especie lo que ha agravado la problemática existente y provocado una disminución de las capturas (INRENARE/ OIMT, 1995 b). En concomitancia con los anteriores planteamientos tenemos que, en la actualidad, en la mayoría de los países del Pacífico americano, la legislación no contempla un régimen jurídico específico que contenga disposiciones especiales de veda, licencia comercial e industrial y talla mínima de captura, aplicables para *Anadara tuberculosa*. Los mecanismos de control no son eficientes y las cantidades extraídas dependen en estos momentos de la disponibilidad del recurso, la capacidad de extracción de los concheros y la demanda del mercado (MICI, 1997).

1.2 Alimentación

Los bivalvos filtran su alimento, principalmente organismos vegetales microscópicos llamados fitoplancton. El alimento óptimo de los bivalvos es indudablemente el fitoplancton ya que constituye la parte principal de la dieta. Otras fuentes de alimentación pueden ser importantes, como las finas partículas de materia orgánica muerta (detritus) con bacterias asociadas y materia orgánica disuelta (FAO, 2006). Se alimentan filtrando el agua durante las mareas altas, concentrando de este modo los contaminantes que se hallan en el agua, los fangos y lodos en los que habitan (Elika, 2012).

1.3 Contaminación

Los contaminantes que concentran los moluscos bivalvos pueden provocar toxiinfecciones en las personas que los consumen. En el caso de los contaminantes microbianos, el peligro se ve potenciado además porque a menudo muchas especies se consumen crudas o poco cocidas, lo que convierte a los moluscos bivalvos en una categoría de alimento de alto riesgo que requiere medidas de control adecuadas (Elika, 2012).

Los mariscos en general, al igual que cualquier otro producto alimentario, pueden contaminarse durante la manipulación, tratamiento, almacenaje, congelación, comercialización, etc. Existen gran variedad de organismos que son capaces de causar serias enfermedades en bivalvos marinos como son los virus, bacteria, hongos, cilióforas, anélidos, copépodos; además de otros que son capaces de producir efectos nocivos. Debido al eficiente mecanismo de filtración que poseen los bivalvos,

estos son capaces de acumular a partir de ambiente que los rodean un gran número de bacterias, las cuales incluyen la representación de géneros *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Bacillus*, *Corynebacterium* y *Micrococcus* (Lodeiros, 1987). Según este autor las bacterias pueden representar una importante fuente de alimento para el microzooplancton el cual, debido a su elevado potencial reproductivo, proliferan rápidamente bajo condiciones favorables del medio ambiente, introduciendo inmediatamente esa biomasa al nivel trófico en el que se encuentran. De este modo, los moluscos son “vectores” de enfermedades, como: fiebre tifoidea y paratifoidea, salmonelosis, cólera, hepatitis viral, etc; lo cual constituye un gran peligro para la salud del consumidor.

1.3.1 Contaminación por bacterias

Salmonella, *Campylobacter*, *Listeria*, *Clostridium*, *Escherichia coli*, *Vibrio parahaemolyticus*, bacterias que están presentes en el medio acuático, el medio ambiente y los seres vivos, y que además de concentrarse en los moluscos bivalvos, pueden multiplicarse y crecer en ellos, llegando a concentraciones que pueden ser causantes de toxiinfecciones alimentarias.

1.3.2 Contaminación por virus

Los virus no se multiplican en los alimentos, por lo que los moluscos solo actúan de vehículo. Los principales virus encontrados en estos alimentos son el virus de la

Hepatitis A y los Norovirus, cuyas principales fuentes son las aguas contaminadas y el ser humano portador de dichos virus.

1.3.3 Contaminación por biotoxinas marinas

Son producidas por algas presentes en el fitoplancton, y que los moluscos acumulan en su organismo, sin que se produzcan cambios organolépticos, por lo que son de difícil detección. Pertenecen a esta categoría:

- Ácido Ocadaico (OA) y sus análogos: Dinofisistoxinas y Pectenotoxinas (PTX)
- Toxinas de los grupos Azaspiraridos (AZA), Yesotoxinas (YTX), Saxitoxinas (STX), y el Ácido Domoico (DA).

Al ingerir moluscos contaminados con estas biotoxinas se pueden dar diferentes tipos de intoxicaciones: intoxicación paralizante (PSP), intoxicación diarreica (DSP), intoxicación neurológica (NSP), intoxicación amnésica (ASP) y ciguatera (en aguas tropicales) La calidad del agua y de los fangos y lodos donde viven enterrados los moluscos son factores determinantes de su futura contaminación (Elika, 2012).

1.4 Microorganismos causantes de enfermedades por el consumo de moluscos contaminados.

1.4.1 Coliformes

El grupo coliforme es constante, abundante y casi exclusivo de la materia fecal, sin embargo, las características de sobrevivencia y la capacidad para multiplicarse fuera del intestino también se observan en aguas potables, por lo que el grupo coliforme se utiliza como indicador de contaminación fecal en agua; conforme

mayor sea el número de coliformes en agua, mayor será la probabilidad de estar frente a una contaminación reciente. Cuando los coliformes llegan a los alimentos, no sólo sobreviven, sino que se multiplican, por lo que en los alimentos el grupo coliforme adquiere un significado distinto al que recibe en el agua (Camacho *et al.*, 2009).

Los microorganismos coliformes constituyen un grupo heterogéneo con hábitat primordialmente intestinal para la mayoría de las especies que involucra. El grupo de bacterias coliformes totales comprende todos los bacilos Gram negativos aerobios o anaerobios facultativos, no esporulados, que fermentan la lactosa con producción de gas en un lapso máximo de 48 h. a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Este grupo está conformado por 4 géneros principalmente: *Enterobacter*, *Escherichia*, *Citrobacter* y *Klebsiella*. El grupo de coliformes fecales, está constituido por bacterias Gram-negativas capaces de fermentar la lactosa con producción de gas a las 48 h. de incubación a $44.5 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$, Este grupo no incluye una especie determinada, sin embargo, la más prominente es *E. coli* (Larrea *et al.*, 2009).

Los coliformes termotolerantes (CTE), denominados así porque soportan temperaturas hasta de 45°C , comprenden un número muy reducido de microorganismos, los cuales son indicadores de calidad por su origen. En su mayoría están representados por la *E. coli*, pero se pueden encontrar de forma menos frecuente las especies *Citrobacter freundii* y *Klebsiella pneumoniae*. Estas últimas forman parte de los coliformes

termotolerantes, pero su origen normalmente es ambiental (fuentes de agua, vegetación y suelos) y solo ocasionalmente forman parte de la microbiota normal. Por esto, algunos autores plantean que el término de coliformes fecales, comúnmente utilizado, debe ser sustituido por coliformes termotolerantes (Larrea *et al.*, 2013).

Los coliformes termotolerantes integran el grupo de los coliformes totales, pero se diferencian de estos últimos, en que son indol positivo, su intervalo de temperatura óptima de crecimiento es muy amplio (hasta 45 °C) y son mejores indicadores de higiene en alimentos y agua. La presencia de estos microorganismos indica la existencia de contaminación fecal de origen humano o animal, ya que las heces contienen coliformes termotolerantes que están presentes en la microbiota intestinal, siendo *E. coli* la más representativa, con un 90-100 % (Larrea *et al.*, 2013).

1.4.2 *Escherichia coli*

Es un bacilo corto Gram negativo que se encuentra clasificado dentro de la familia Enterobacteriaceae (bacterias entéricas) y existe como comensal en el intestino delgado de humanos y animales. Sin embargo, hay algunas cepas de *E. coli* patógenas que provocan enfermedades diarreicas. Estas *E. coli* se clasifican con base en las características que presentan sus factores de virulencia únicos y cada grupo provoca la enfermedad por un mecanismo diferente. Las propiedades de adherencia a las células epiteliales de los intestinos grueso y delgado son codificadas por genes situados en plásmidos. De manera similar, las toxinas son mediadas por plásmidos o fagos (Camacho *et al.*, 2009).

E. coli es un microorganismo comensal cuyo nicho es la capa mucosa del colon de los mamíferos. Esta bacteria es la más abundante de los anaerobios facultativos de la microflora intestinal humana, la cual se distribuye ampliamente en el tracto intestinal animal y a menudo, no es patógena. Sin embargo, diferentes cepas pueden causar enfermedades gastrointestinales, urinaria o del sistema nerviosos central. En la actualidad, seis categorías de patotipos de *E. coli* han sido reconocido: enterotoxigénica *E. coli* (ETEC), enteropatógeno *E. coli* (EPEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC), enterohemorrágica *E. coli* (EHEC, *Escherichia coli* productora de toxina Shiga o STEC), enteroagregativa *E. coli* (CEEA o EA_ggEc) y difusamente adherente (DAEC) del *E. coli* (Albuquerque, 2013). Existen otras cepas que no han sido perfectamente caracterizadas; de las cepas anteriores, las 4 primeras están implicadas en intoxicaciones causadas por el consumo de agua y alimentos contaminados (Camacho *et al.*, 2009).

Escherichia coli enterotoxigénica ETEC: El microorganismo es capaz de producir dos tipos de toxina. Una toxina termolábil de aproximadamente 89 kDa cuya secuencia, antigenicidad y su función es similar a la toxina del cólera, la otra toxina que produce es termoestable y es de bajo peso molecular (4 kDa) y es capaz de resistir temperaturas de ebullición hasta por 30 minutos (Camacho *et al.*, 2009).

Escherichia coli enteropatógena ECEP: El microorganismo produce dos proteínas: la intimina que es codificada por el gen *eae* y un factor de adherencia que es codificado por un plásmido, ambas proteínas permiten su unión a los enterocitos y la destrucción de las microvellosidades intestinales (Camacho *et al.*, 2009).

Escherichia coli enteroinvasiva EIEC: Algunas características importantes de este microorganismo que permiten diferenciarlo de la cepa típica de *E. coli* son: No utiliza la lactosa como fuente de carbono, no descarboxilan la lisina, es inmóvil y anaerogénicos. La patogenicidad de este organismo se debe a su capacidad para invadir y destruir el epitelio del colon debido a que es capaz de evadir la lisis en los fagolisosomas (Camacho *et al.*, 2009).

Escherichia coli enterohemorrágica EHEC produce verotoxina, denominada así por su efecto citotóxico sobre las células Vero, una línea de células renales de monover de africano (Camacho *et al.*, 2009).

1.4.3 Enterococos

Inicialmente, los enterococos pertenecían al género *Streptococcus* grupo D de Lancefield y en 1970, fueron oficialmente clasificados por Kalina como un género independiente. La división de los géneros se basó en estudios taxonómicos y moleculares. Los enterococos son células esféricas u ovoides, de tamaño 0,6 - 2,0 × 0,6 - 2,5 µm. Se presentan en forma de pares o de cadenas cortas. Son cocos Gram positivos, no formadores de endosporas y no motiles. Son microorganismos anaerobios facultativos, quimiorganotrofos, con metabolismo fermentativo. Su crecimiento óptimo es a 37 °C. Tienen la habilidad de crecer en presencia de 6,5 % de NaCl, entre 10 a 45 °C y a pH 9,6. Son capaces de hidrolizar la esculina en presencia de 40 % de bilis, debido a que poseen la enzima pirrolidonil arilamidasa. Las colonias

en los medios agarizados, generalmente se presentan incoloras a grises, y tienen de 2 a 3 mm de diámetro a los dos días de incubación (Larrea *et al.*, 2013).

Larrea *et al.*, (2013), Plantean que una misma cepa puede variar en sus propiedades hemolíticas en dependencia del animal del que provenga la sangre empleada en el medio de cultivo. Por otro lado, los enterococos también pueden estar presentes en suelo, alimentos, agua, plantas, animales e insectos y suelen considerarse buenos indicadores de contaminación fecal debido a que son muy resistentes a condiciones adversas como la congelación y la desecación.

1.4.4 *Clostridium perfringens*

C. perfringens es un bacilo Gram positivo bastante grueso, recto, no posee cilios por lo tanto es inmóvil, anaerobio, capsulado; las esporas, poco usuales de verse in vitro son grandes, ovales, centrales o subterminales deformantes. Se ha comprobado que esta especie causa una variedad de enfermedades de diferente severidad como la gangrena gaseosa, enteritis necrótica e intoxicaciones alimentarias (Muñoz *et al.*, 2010).

C. perfringens produce un gran número de toxinas con actividades muy variadas. En base a la producción de cuatro toxinas letales mayores, han sido separados en cinco tipos, nombrados con las letras de la A a la E por Sterne y Warrack. *C. perfringens* tipo A, ocupa el tercer lugar entre los agentes etiológicos más comunes de intoxicación

alimentaria. También es causa importante, en todo el mundo, de enterocolitis necrotizante en niños y adultos (Muñoz *et al.*, 2010).

Numerosas investigaciones epidemiológicas han revelado que la mayoría de los brotes de enfermedades transmitidas por alimentos, en donde *C. perfringens* ha estado involucrado, ha sido por el consumo de productos cárnicos y productos avícolas que contienen gran número de células viables. Las células vegetativas esporulan al llegar al intestino delgado. Durante la formación de esporas se produce una potente enterotoxina que causa diarrea y la enfermedad tiende a ser moderada, provocando que los pacientes se recuperen, por lo general, a los 2 a 3 días de inicio de síntomas. Los datos del Centro para el Control y la Prevención de enfermedades de los EE. UU (CDC, EE. UU) señalan que es causante de un 5,4% de los brotes y un 16,6% de los casos de enfermedades son atribuibles al pescado, aunque es posible que muchos casos pasen desapercibidos y no sean reportados debido a que la enfermedad no es severa y no acuden a los hospitales (Muñoz *et al.*, 2010).

La ventaja más importante es que sus esporas sobreviven en el agua por mucho más tiempo que los organismos del grupo coliformes y son resistentes a las condiciones ambientales. Las normas actuales para evaluar la calidad microbiológica de áreas marinas para fines recreativos y cuerpos de agua destinados para la cría o explotación de moluscos bivalvos, se basan en el análisis de coliformes totales, coliformes fecales y *E. coli*, pero no incluyen una evaluación de la distribución y/o densidad de *C. perfringens*. Diversos autores han señalado a este microorganismo como una

alternativa viable a los actuales indicadores de contaminación fecal (Muñoz *et al.*, 2010).

1.5. Clasificación de la zona de producción según SERNAPESCA (2015)

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* por cada 100 gramos (g) de carne de molusco y líquido intervalvar, considerando 5 tubos y 3 diluciones, según Norma Chilena indicada en Norma Técnica LAB/NT7.
3. No contendrán *Salmonella* en 25 g de carne de molusco.
4. En el caso de ostras, no contendrán Norovirus en 15 g de hepatopáncreas.
5. 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.
6. La cantidad de veneno paralítico del molusco, VPM, 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 UE.

7. 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.
8. El nivel máximo de yesotoxinas en moluscos bivalvos, tunicados y equinodermos (el cuerpo entero o cualquier parte comestible por separado) será de 3.75 mg de y esa toxina/kg, de acuerdo con el método biológico o con métodos de detección alternativos.
9. 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.

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* por cada 100 g de carne y líquido intervalvar en el que se utilicen 5 tubos y 3 diluciones, según Norma Chilena indicada en Norma Técnica LAB/NT7. El 10% restante no podrá ser superior a 46 000 NMP de *E. coli* por cada 100 gramos 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, y/o.
3. Los moluscos bivalvos podrán someterse, previo a su consumo, a alguno de los procesos establecidos en la norma técnica CTT/NT1.

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 *Escherichia coli* por cada 100 g de carne y líquido intervalvar, en el que se utilicen 5 tubos y 3 diluciones, según Norma Chilena indicada en Norma Técnica LAB/NT7.
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, y/o.
3. Los moluscos bivalvos podrán someterse, previo a su consumo, a alguno de los procesos establecidos en la norma técnica CTT/NT1.

1.6 Medidas de control

El mejor método para producir moluscos de una manera segura es el cultivo y la recolección en áreas que no estén sometidas a ninguna fuente externa de contaminación, aunque hay que señalar que estas áreas son muy escasas, por lo que

generalmente es necesario un proceso posterior de depuración o reinstalación (Elika, 2012).

La depuración es una técnica aplicada en muchas partes del mundo para eliminar los contaminantes microbianos de aquellos moluscos bivalvos que estén ligeramente o moderadamente contaminados, poniéndolos en tanques de agua de mar limpia para que lleven a cabo su actividad normal de bombeo durante un periodo de tiempo que puede variar desde unas horas hasta varios días. Normalmente la depuración se lleva a cabo por exigencias de la legislación internacional, nacional o local, pero también se aplica como iniciativa de la industria para proteger a sus consumidores, o para demostrar la diligencia debida a satisfacer los requisitos legales de otros países o regiones a los que se vaya a exportar (Lee *et al.*, 2010).

En Europa se cuenta con una larga experiencia en la utilización de este proceso para superar los problemas causados por la contaminación fecal de zonas de cría de moluscos bivalvos provocada por la gran concentración de población existente en las zonas costeras y debidas asimismo a las prácticas ganaderas extensivas. Aunque en los Estados Unidos de América (EE. UU) existe también una larga tradición de depuración, la mayor disponibilidad de aguas costeras en un estado relativamente prístino ha hecho que los esfuerzos se concentren más en la cría de moluscos en esas zonas en lugar de eliminar la contaminación una vez recolectados (Lee *et al.*, 2010).

La depuración también se ha practicado de manera relativamente común en Australia y Japón, y en menor medida en Nueva Zelanda. En general, los moluscos que se

comercializan en muchas otras partes del mundo no son objeto de requisitos higiénicos específicos, por lo que la depuración en esas zonas no se ha aplicado (Lee *et al.*, 2010).

Depuración tan solo eliminará niveles bajos y moderados de contaminantes microbianos y no se puede emplear en moluscos muy contaminados. Hay también limitaciones que se refieren a los tipos de microbios que pueden eliminarse satisfactoriamente a través de estos procesos (Lee *et al.*, 2010).

Aunque la depuración se basa en la provisión de las condiciones fisiológicas correctas para que los moluscos puedan llevar a cabo su actividad de bombeo, la efectividad máxima de la eliminación de la carga microbiana, especialmente en el caso de los virus, se produce en un rango más estrecho que en el que se da esta actividad (Lee *et al.*, 2010).

CAPÍTULO II
MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 MATERIALES

2.1.1 Equipos de laboratorio: Máquina de hielo ICE-O-MATIC Modelo CF450A38P, Autoclave Yamato SM200, Licuadora SANKEY Modelo BL-1576C, Incubadora LAB-LINE 120; Thermolyne 142300, Refrigeradora BIO SAMSUNG Modelo SR-38NMB; VWR Scientific, Jarra de anaerobiosis, Agitador con Baño Maria Precision Scientific 66800, Lámpara de luz UV Modelo EA-160, AUTOSTILL 5 (Destilador) SplitStream Wheaton, Balanza analítica Denver Modelo 4101, Balanza analítica METTLER AE200, Balanza semi – analítica METTLER P163, Cámara de flujo laminar LABCONCO Modelo NSF, Micropipetas Finnpiquette Digital 40-200 µl, Micropipetas Eppendorf 1000 µl, Puntas OXFORD, size 1-200 µl, 201-1000 µl, Asa bacteriológica.

2.1.2 Cristalería: Pipetas estériles KIMAX (5 ml, 10ml), tubos Durham, frasco de mayonesa, Probeta (50ml, 1000ml) KIMAX, Tubos de ensayo con rosca (5 ml, 20ml), Erlenmeyer KIMAX, Vasos químicos (100ml, 600ml) KIMAX.

2.1.3 Medios de cultivos y Reactivos: Caldo Lauril Sulfato de triptosa, Caldo EC MUG, Caldo EC, Agar SPS (Agar selectivo para *Clostridium perfringes*), Peróxido de hidrogeno, Agar m-Enterococcus

2.1.4 Otros materiales: Gradillas, Asas bacteriológicas, espátula, tubos de ensayo con tapas, vasos químicos, probetas, botellas de dilución, guantes desechables.

2.2 METODOLOGÍA

2.2.1 Sitios de muestreos

Tomándose en cuenta la accesibilidad de las zonas de producción de moluscos bivalvos y el nivel de comercialización de dichos productos, la ubicación cartográfica fue la observada a continuación:

ZONAS DE MUESTREO	UBICACIÓN
Zona N° 1 Playa Bique	8°53'37.14" N 79°39'23.33" O
Zona N° 2 El Espavé	8°39'29.78" N 79°52'56.82" O
Zona N° 3 Chinina	9°07'30.80" N 79°03'50.86" O

Zona 1: Se encuentra en la provincia de Panamá Oeste, distrito de Arraiján a unos 30 Km de la Ciudad de Panamá, en la Bahía de Panamá. 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 nitida* (Smithsonian, 2013).

En ella la población aledaña extrae grandes cantidades *Protothaca aspérrima* o almeja blanca. El primer reporte de la extracción de este producto en esta playa se remonta al trabajo de Águila *et al.*, (1978), donde observaron cómo los habitantes del lugar extraían grandes cantidades de este molusco. Desde este momento se han continuado los estudios en el área, como los de Muñoz y Díaz (1984), Telesca y Visuetti (1985), Grajales y Vergara (1996), Morales y Green (1997), López Gutierrez (1998), en los cuales se ha seguido reportando la explotación de este producto en dicha playa.

Esto Nos lleva a sugerir que la población de *P. asperrima*, a pesar de esta explotación, se ha mantenido estable.

Zona 2: 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 (Ecu Red, 2010).

Zona 3: Se encuentra en la provincia de Panamá, distrito de Chepo, es el puerto más importante del este de Panamá, y está a solo 40 minutos desde Tocumen. 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 Coquirá 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).

2.2.2 Diseño experimental

El muestreo se realizó en las tres zonas de producción durante las mareas bajas de los meses de agosto, septiembre y octubre. En cada mes se tomaron 3 muestras de cada una de las 3 zonas de producción. Cada una consistió de un peso aproximado

de 3 libras las cuales fueron transportadas en una hielera aproximadamente a 4 °C y procesadas de inmediato en los laboratorios de Microbiología Experimental y Aplicada (LAMEXA) y Microbiología de Aguas (LAMA).

2.2.3 Procesamiento de las muestras

Las almejas fueron lavadas superficialmente con agua y detergente para luego ser abiertas y extraerles el cuerpo y el líquido intervalvar. Este paso se hizo hasta completar 100 g de la muestra. Los 100 g del cuerpo y líquido intervalvar se mezclaron con 100 mL de buffer de fosfato [1.25 ml de KH_2PO_4 (1N NaOH en pH 7.2) + 5.0 ml de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$] (Canadian Shellfish Sanitation Program, 2010), previamente esterilizado y se licuaron obteniendo la dilución madre. De este licuado se pesaron 10 g, que se agregaron a 90 mL de buffer igualmente esterilizado para obtener una dilución 10^{-1} , de esta dilución se tomaron 10 ml para mezclarlo con 90 ml de buffer de fosfato y así obtener la dilución 10^{-2} ; de esta dilución igualmente se tomaron 10 ml para mezclarlo con 90 ml de buffer y así obtener la dilución de 10^{-3} , teniendo en cuenta que en ocasiones se hizo diluciones hasta 10^{-4} dependiendo de la zona de muestreo, esta última se obtuvo a partir de la dilución de 10^{-3} con los pasos anteriormente mencionados. Este procedimiento se repite para cada muestra recolectada (Canadian Shellfish Sanitation Program, 2010).

2.2.4 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

2.2.4.1 Prueba Presuntiva

Luego de realizar cada dilución, estas se sembraron en tubos de ensayos con Durham y caldo lauril sulfato realizando la técnica de tubos múltiples. Estos tubos se incubaron a 37°C por 24 a 48 horas. El crecimiento y la producción de gas fueron necesarios para obtener un resultado positivo (Canadian Shellfish Sanitation Program, 2010).

2.2.4.2 Coliformes termotolerantes

Todos los tubos positivos de la prueba presuntiva, anteriormente mencionada, se pasaron a tubos de ensayos con Durham y medios EC mediante azadas y se incubaron a 44°C por 24 a 48 horas. Terminado el periodo de incubación todos los tubos con crecimiento y producción de gas se consideraron como positivos (Canadian Shellfish Sanitation Program, 2010).

2.2.4.3 *Escherichia coli*

De los tubos positivos en medios EC, se pasaron mediante azadas a tubos con medios EC MUG y se incubaron a 37°C por 24 a 48 horas. Se consideraron como positivos aquellos tubos que presentaron fluorescencia en presencia de luz ultravioleta (Canadian Shellfish Sanitation Program, 2010).

2.2.4.4 Estreptococos fecales

Se prepararon tubos con caldo dextrosa azida utilizando la técnica de tubos múltiples, estos fueron incubados a 37°C por 24 a 48 horas. Transcurrido el tiempo necesario se consideraron como tubos positivos aquellos que presentaron un precipitado blanco (Eaton *et al.*, 2005).

Para una prueba confirmativa, los tubos positivos se pasaron mediante rayado por dilución a platos Petri con medio m-Enterococcus Agar. Se incubaron a 40° C por 24 a 48 horas. Considerándose como positiva aquellas colonias que resultaron negativas para la prueba de catalasa y confirmando estas con la tinción de Gram (Eaton *et al.*, 2005).

2.2.4.5 *Clostridium perfringens*

Se procedió a inocular tubos con medio que contenían sulfato ferroso y leche entera, mediante la técnica de tubos múltiples (Abeyta y Wetherington, 1990). Luego que los tubos se inocularan se colocaron en baño maría a 80°C por 10 minutos, y se procedió a incubar a 37°C por 24 a 48 horas (Rhodehamel y Harmon, 1998).

Transcurrido el tiempo necesario, los tubos que presentaron la leche cuajada se tomaron como positivos y se procedió mediante la técnica de estriación a inocular los platos Petri con medio SPS. Estos platos se colocaron de manera invertida en un sistema anaeróbico con BD GasPak™ Ez, a una temperatura de 37° C por 24 a 48 horas. Aquellas colonias que se tornaron de color negro se tomaron como positivas para *Clostridium perfringens* (Rhodehamel y Harmon, 1998).

CAPÍTULO III
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 RESULTADOS

3.1.1 Zonas de producción

Se determinó la presencia de cuatro parámetros microbiológicos en muestras de almejas de tres zonas de producción. El primer parámetro fue el de coliformes termotolerantes, y presentó valores de 170,951.9 NMP/100g (Chinina), 64,356.2 NMP/100g (Playa Bique), y 14,162 NMP/100g (El Espavé), respectivamente. De acuerdo con este parámetro, los sitios de producción de Chinina y Bique están por debajo de la categoría C, mientras que El Espavé se ubica en categoría C (Cuadro 1). Al comparar las medias geométricas obtenidas por zona de producción para este parámetro, se observó que hay diferencias significativas entre los diferentes sitios de muestreo ($p= 0.006$) (Figura 15).

El siguiente parámetro determinado fue del indicador *Escherichia coli*, que presentó valores de 17,675.6 NMP/100g (Playa Bique), 1,549.1 NMP/100g (Chinina), y 0 NMP/100g (El Espavé), respectivamente (Cuadro 1). De acuerdo con este parámetro, el sitio de producción de playa Bique se ubica en categoría C; el sitio de Chinina, en categoría B, y El Espavé, en categoría A. Al comparar las medias geométricas obtenidas por zona de producción para este parámetro, se observó que, al igual que en el caso anterior, hay diferencias significativas entre los diferentes sitios de muestreo ($p= 0.001$) (Cuadro 1 y Figura 17).

En cuanto al indicador *Clostridium perfringens*, este parámetro presentó valores de 57.3 NMP/100g (Playa Bique), 13.4 NMP/100g (Chinina), y 4.9 NMP/100g (El Espavé), respectivamente (Cuadro 1). No se observó diferencias significativas para este indicador entre las zonas de producción ($p = 0.055$) (Figura 21).

El cuarto indicador utilizado como parámetro microbiológico para comparar las zonas de producción fue *Streptococcus*. Este presentó valores de 2,038.2 NMP/100g (Playa Bique), 1,042.3 NMP/100g (Chinina), y 515.9 NMP/100g (El Espavé), respectivamente (Cuadro 1). Al comparar las medias geométricas obtenidas por zona de producción, se observó que no hay diferencias significativas entre los diferentes sitios de muestreo ($p = 0.304$) (Figura 19).

3.1.2 Meses de muestreo

El comportamiento de los coliformes termotolerantes en los diferentes meses de muestreo fue de la siguiente manera: 116,912.3 NMP/100g (agosto), 25,142.2 NMP/g (septiembre) y 53,007.8 NMP/100g (octubre), respectivamente (Cuadro 2). Estos resultados colocan al mes de agosto por debajo de la categoría C, y tanto a los meses de septiembre y octubre, en categoría C. Sin embargo, al comparar las medias geométricas de cada mes de muestreo, no se observó que hubo diferencias significativas en la carga microbiana ($p = 0.244$) (Figura 14).

En el caso de *E. coli*, el comportamiento durante los meses de muestreo fue el siguiente: 21.2 NMP/100g (agosto), 530.0 NMP/g (septiembre) y 2,431.5 NMP/100g

(octubre), respectivamente (Cuadro 2). Estos resultados colocan al mes de agosto en la categoría A, y tanto a los meses de septiembre y octubre, en categoría B. En este caso, al comparar las medias geométricas obtenidas para cada mes, se observó que había diferencias significativas ($p = 0.043$) (Figura 16).

Para el indicador *Clostridium perfringens*, las medias geométricas fueron de 41.9 NMP/100g (agosto), 4.8 NMP/g (septiembre) y 18.6 NMP/100g (octubre), respectivamente. Por otro lado, para los estreptococos las medias geométricas fueron de 2,308.4 NMP/100g (agosto), 1,293.9 NMP/g (septiembre) y 366.4 NMP/100g (octubre), respectivamente (Cuadro 2). En ninguno de los dos casos se observó diferencias significativas ($p = 0.137$ y 0.152 , respectivamente) (Figuras 20 y 18).

3.2 DISCUSIÓN

En las zonas de producción de bivalvos de Bique, Espavé y Chinina, los niveles de coliformes termotolerantes mostraron valores muy por encima de los límites permitidos para el consumo directo, según lo establecido en la Norma de la Unión Europea relativo a los criterios microbiológicos, es decir, por debajo de la categoría C, siendo Chinina la zona más contaminada, seguido por Bique y, por último, El Espavé. Esta última zona de producción fue la única en categoría C. Sin embargo, los niveles de *Escherichia coli* presentan un comportamiento diferente, pues según estos, Bique es la zona de producción más contaminada (categoría C), seguida de Chinina (categoría B) y, por último, El Espavé (categoría A). Según un estudio realizado por Hernández (2004), nos indica que la calidad microbiológica de las almejas *P. asperima* y *D. panamensis* fue más bajo ya que solamente una de las muestras de *D. panamensis* cumplió con las normas para el consumo humano, categoría A, mientras que nuestros resultados mostraron una calidad microbiológica más alta ya que *Donax* pertenece a categoría B, al igual que en el estudio realizado por Saldaña y colaboradores en el 2006 y *Anadara* pertenece a categoría A. Lo anterior indica que las muestras de almejas analizadas en el año 2004 según estudio de Hernández no eran aptas para el consumo humano debido al riesgo que existe para la salud humana. Las almejas provenientes de zonas de producción de categoría C, requieren un tratamiento de depuración de al menos dos meses para la eliminación de microorganismos que representen un riesgo a la salud humana (Barile *et al.*, 2009), como es el caso de Bique que los moluscos bivalvos de esta zona necesitan pasar obligatoriamente por un proceso de depuración para ser consumidas, mientras que las almejas del sitio de Chinina perteneciente a categoría

B, necesitan pasar por un tratamiento térmico o proceso de depuración, todo lo contrario a la zona El Espavé que los moluscos bivalvos se pueden consumir directamente sin necesidad de un tratamiento térmico y/o proceso de depuración según nuestros resultados. Los principales peligros asociados al consumo de moluscos se derivan de la contaminación microbiológica de las aguas donde se crían, sobre todo cuando los moluscos bivalvos se destinan al consumo en crudo. Dado que son filtradores, los moluscos concentran contaminantes a un nivel muy superior al de su entorno acuático (Lee *et al.*, 2010). Las enterobacterias representan uno de los grupos de bacterias más relevantes para la salud pública, que contaminan los productos marinos. La presencia de estas bacterias se debe a la contaminación del agua con residuos humanos (Pereira *et al.*, 2006).

Un comportamiento semejante al de *E. coli* se observó con los parámetros *Clostridium perfringens* y estreptococos totales, aunque estos no forman parte de la Norma Europea y, como se indicó con anterioridad, no mostraron diferencias significativas. Este comportamiento sugiere que *E. coli* es un mejor indicador para diferenciar entre categorías de zonas de producción.

Los niveles de contaminación pueden deberse a que las altas poblaciones bacterianas se relacionan con los detritos orgánicos animales (aves y mamíferos), y desechos humanos que son aportados hacia las costas constantemente por el agua de lluvia (Romero, 1981), las fuentes de agua y las descargas directas a las costas de aguas residuales sin ningún tipo de tratamiento. Y en el caso de Chinina y Bique, estos resultados muestran que la contaminación de estas dos zonas de producción va

en aumento, ya que en el estudio previo realizado por Saldaña y col. (2006), ambas zonas se clasificaban en categoría B. Por otro lado, el mismo estudio muestra que El Espavé se ha mantenido en niveles que lo ubican en la categoría A, para el parámetro *E. coli*, ya que este microorganismo forma parte de la flora intestinal tanto del hombre como de animales de sangre caliente, y su presencia indica contaminación reciente (Arcos *et al.*, 2005), y su capacidad para sobrevivir y reproducirse en el agua es restringida, dado el estrés fisiológico que presenta el medio acuoso (Ríos *et al.*, 2017). Además, la masa de agua de la bahía de Chame está constantemente renovada, y en la estación lluviosa las variaciones en los parámetros hidrológicos presentan una marcada estacionalidad, en donde el aporte de aguas continentales en esta estación, modifican la parte interna de la bahía, originando un desplazamiento hacia afuera (Araúz, 1995). El agua de mar y los detritos transportan microorganismos a los moluscos que viven en áreas que distan kilómetros de la salida de las aguas residuales o de la desembocadura de los ríos contaminados (Stansby, 1971), lo cual sucede en forma tenue en la estación seca (diciembre-abril). Dos de los ríos que bañan la bahía de Chame (ríos Capira y Sajalices), mantienen una densidad baja de drenaje debido a que sus afluentes lo componen quebradas que sólo poseen agua durante la estación lluviosa. Además, los procesos mareales, como los vientos del norte, de mayor intensidad en esos meses, destruyen la estructura salina ligeramente estratificada (en la estación lluviosa), resultando en una estructura esencialmente oceánica (Araúz, 1995). Esto explicaría por qué esta zona se mantiene con un bajo nivel de contaminación, Aunque se ve amenazada por el aumento de asentamientos humanos y las consecuencias de la contaminación doméstica (Hernández y García, 1995). En cuanto al comportamiento de los indicadores microbianos durante los meses de

muestreo, según el parámetro coliformes termotolerantes, el mes de agosto fue el de mayor grado de contaminación. Luego, disminuyó en septiembre para volver a aumentar un poco en octubre. Aunado a esto, los resultados no eran significativamente distintos. Tampoco se observó consistencia en los valores observados para *Clostridium perfringens* y estreptococos totales. Sin embargo, para el indicador *Escherichia coli*, el mes de agosto fue el que presentó menos niveles de contaminación. Además, la misma iba aumentando de agosto a octubre, y las diferencias sí fueron significativas a pesar de que las categorías fueron A (en agosto) y B (septiembre y octubre). Esto también apoya la idea de que *E. coli* es un mejor indicador para diferenciar entre categorías.

Según el estudio realizado por Saldaña y colaboradores (2006), los meses de abril a mayo son los mejores para la recolecta y consumo de diferentes especies de bivalvos, ya que, por ser un período de transición de la época seca a la lluviosa, no se registran lluvias constantes. Por lo tanto, no hay un arrastre de sustancias tanto abióticas como bióticas que afecten de manera significativa, ya que los mares, ríos y lagos son los vertederos eventuales para muchas de las sustancias nocivas o de desechos ocasionados por el hombre (Barnes y Rupper, 1996). Sin embargo, para los meses de mayo, junio, septiembre y octubre se encontró una alta contaminación debido a que en estos meses han comenzado las lluvias de manera constantes y en ocasiones muy fuertes, demostrando que hay un arrastre de materiales fecales de animales e incluso del hombre que llega hasta las playas por las corrientes ocasionadas por las lluvias (Kwiecinski *et al.*, 1994).

CAPÍTULO IV
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 CONCLUSIONES

1. De acuerdo a nuestros resultados las especies *Donax punctatostratus*, *Protothaca asperrima* y *Anadara tuberculosa* fueron diferentes con respecto a su calidad microbiológica en las tres zonas de producción.
2. De acuerdo a nuestros estudios realizados según el parámetro coliforme termotolerantes las tres zonas de producción se ubican en categoría C en cambio con el parámetro *E. coli* se ubica a Playa Bique en categoría C, Chinina en categoría B y El Espave en categoría A con esto se nos permite concluir que *E. coli* es un mejor discriminador.
3. Los Indicadores *Clostridium perfringens* y Estreptococo fecales mostraron mayor contaminación en Playa Bique y menos en el Espave.
4. En cuanto a los meses de colecta los resultados obtenidos para Coliformes termotolerantes no fueron concluyentes porque todo lo ubicaba en categoría C pero vemos con *E. coli* que la contaminación fue al final del periodo de muestreo.

5. Según los estudios realizados los bivalvos que se encuentran en la Zona de producción de Playa Bique y el Espave son aptos para el consumo humano.

6. Los bivalvos encontrados en la zona de producción de Chinina Mostraron una mayor contaminación haciéndolos no aptos para el consumo humano

4.2 RECOMENDACIONES

Tomando en cuenta los resultados obtenidos en el estudio realizado se recomienda:

1. Realizar estudios en la estación seca del año para observar que tan asociado está el clima con el aumento de contaminación.
2. Prolongar el tiempo de muestreo, aumentando la cantidad de meses en el estudio.
3. Hacer estudios sobre otros tipos de contaminación biológica en los moluscos como virus, parásitos y biotoxinas marinas.
4. Investigar si las comunidades aledañas a estas zonas de producción están vinculadas directamente con la contaminación.
5. Desarrollar campañas para concientizar a la población sobre el riesgo que causa la contaminación en nuestras aguas costeras.

BIBLIOGRAFÍA

- Abeyta, C; J. Wetherington. 1990. The use of Iron Milk Method for recovering *Clostridium perfringens* from shellfish. Food and Drug Administration. Seafood Product Research Center. Bothell, Washington, U.S.A. Laboratory Information Bulletin. 5 pp.
- AESAN, 2011. Informe del Comité Científico sobre Contaminación Virica de los alimentos, con especial énfasis en moluscos bivalvos, y medidas de control.
- Albuquerque, R. 2013. *Escherichia coli* in seafood: A brief overview. Obtenido de: <http://dx.doi.org/10.4236/abb.2013.43A060>.
- Baqueiro, C; M. MUCIÑO; R. MERINO. 1982. Análisis de una población de pata de mula *Anadara tuberculosa* sujeta a explotación intensiva en la Bahía de la Paz, Baja California Sur México. *Ciencia Pesquera* 3: 75-82. Obtenido de: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-88972003000200007
- Barile, N; M. Scopa; E. Nerone; G. Mascilongo; S. Recchi; S. Cappabianca; L. Antonetti. 2009. Study of the efficacy of a closed cycle depuration system on bivalve molluscs. Obtenido de: www.izs.it/vet_italiana/2009/45_4/555.pdf.
- Berdiales, J; J Chavarria. 2009. Informe del componente de manglar región de Panamá Oeste. http://www.itto.int/files/itto_project_db_input/2457/Technical/info%20chame%20manglar%20I%20y%20II.pdf
- Bofill, S; P. Clemente; N. Albiñana; C. Motes; A. Hundesa; R. Girones. 2005. Efectos sobre la salud de la contaminación de agua y alimentos por virus emergentes humanos. Departamento de Microbiología. Facultad de Biología. Universidad de Barcelona. Obtenido de: <http://www.scielosp.org/pdf/resp/v79n2/v79n2a12.pdf>.
- Camacho, A; Giles; Ortegón; B. Serrano; O. Velázquez. 2009. Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos. 2ª ed. Facultad de Química, UNAM. México. Obtenido de: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/TecnicBasicas-Colif-tot-fecales-Ecoli-NMP_6529.pdf.
- Campo, M .2014. "Toxinas del veneno diarreico de mariscos favorecen un ambiente tumorigénico en células gástricas epiteliales". Obtenida de: <http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/131676/Toxinas-del-veneno-diarreico-de-mariscos-favorecen-un-ambiente.pdf?sequence=1>
- Campos, J. 1988. Estudio de la población y potencial para el cultivo de *Anadara tuberculosa* en la Reserva Forestal Sierpe-Térraba, Costa Rica. San José, Costa Rica. 204 P.

- Canadian Shellfish Sanitation Program. 2010. Manual of operations. Chapter 2. Growing area survey and classification. Annex 2b. Bacteriological procedures.
- Castilla, M. 2007. Transferencia tecnológica en el cultivo de ostras *Crassostrea gigas*. Obtenido de: http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/24/24_0074.pdf.
- Eaton, A; L. Clesceri; E. Rice; A. Greenberg. 2005. StandarMethods for the Examination of Water & Wastewater. Edición 21. Editorial American Public Health Association. 1600 paginas.
- EcuRed. 2010. Historia de Chame. Obtenida de: https://www.ecured.cu/Distrito_Chame.
- Elika. 2012. Moluscos Bivalvos medidas para evitar riesgos. Obtenida de: <http://www.elika.eus/datos/articulos/Archivo1287/berezi@%2032%20-%20MOLUSCOS%20BIVALVOS.pdf>.
- FAO. 2006. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Obtenida de: URL: <http://www.fao.org/3/a-a0699s.pdf>.
- Fisher, W; F. Krupp; W. Schneider; C. Sommer; E. Carpenter; V. Niem. 1995. Guía FAO para la Identificación de especies para los fines de la pesca Pacifico Centro-Oriental. Roma, FAO. v. 1, 646 p. (Plantas e invertebrados).
- García, N; A. Prieto; R. Alzola; C. Lodeiro. 2003. Crecimiento y distribución de tallas de *Donax denticulatus* (Mollusca: Donacidae) en playa Brava, península de Araya, estado Sucre, Venezuela. Obtenido de: <http://www.produccioncientificaluz.org/index.php/cientifica/article/viewFile/15014/14991>.
- Gil, C. 2016. Bivalvos, características y clasificación. Obtenido de: <https://invertebrados.paradis-sphynx.com/moluscos/bivalvos-caracteristicas-clasificacion.htm>.
- Guerrero, J. 2010. Puerto Coquira. Obtenida de: www.actiweb.es/jessyguerrero/puerto_coquira.htm.
- Hernández, J. 2004. Análisis de la calidad microbiológica de dos especies de bivalvos *Protothaca* (Leukoma), *Asperima* (Sowerby, 1835) y *Donax Panamensis* (Philippi, 1849).
- INRENARE/ OIMT. 1995 b. Proyecto Manejo, Conservación y Desarrollo de los manglares de Panamá. Estudio de la pesca artesanal en la región de Chame, Azueroy Chiriquí. Panamá, Panamá. 139 P.

Jahncke, M; G. Spencer; A. Reilly; R. Martin; E. Cole. 2002. Public, Animal, and Environmental Aquaculture Health Issues. USA: John Wiley and Sons.

Larrea, J; M. Rojas; B. Romeu; N. Álvarez; M. Rojas; M. Pérez. 2013. Bacterias indicadoras de contaminación fecal en la evaluación de la calidad de las aguas: revisión de la literatura. Obtenida de: <http://revista.cnic.edu.cu/revistaCB/articulos/bacterias-indicadoras-de-contaminaci%C3%B3n-fecal-en-la-evaluaci%C3%B3n-de-la-calidad-de-las-aguas>.

Lee, R; A. Lovatelli; L. Ababouch. 2010. Depuración de bivalvos: aspectos fundamentales y prácticos. FAO Documento Técnico de Pesca. No. 511. Roma, FAO. 153pp. Obtenido de: <http://www.fao.org/docrep/014/i0201s/i0201s.pdf>.

Lodeiros, S.1987. Algunas condiciones del cultivo y patología de los moluscos bivalvos marinos. Universidad de oriente Instituto Oceanográfico de Venezuela. Departamento de Biología Pesquera. Área de acuicultura. Venezuela.

López, D; A. Buschmann; M. González. 1988. Efecto del uso de zonas costeras por prácticas de acuicultura. Medio Ambiente 9: 42-54.

Maturell, J; V. Morales; V. Quiróz. 1992. Diagnóstico de la Acuicultura de los moluscos bivalvos de Panamá. Panamá, Panamá. 93 P.obtenida de: <http://www.oceandocs.org/bitstream/handle/1834/8123/Guia%20B%C3%A1sica%20para%20el%20cultivo%20de%20Molusco%20en%20Panam%C3%A1.pdf?sequence=1>

Menéndez, G. 1998. Evaluación del crecimiento de la ostra del Pacífico (*Crassostrea gigas*) en un Sistema Tipo Línea Larga. Seminario T.U.A. Guatemala.

MICI 1997. Exportación anual de *Anadara tuberculosa*. Panamá. 35 Obtenida de: <http://www.oceandocs.org/bitstream/handle/1834/8123/Guia%20B%C3%A1sica%20para%20el%20cultivo%20de%20Molusco%20en%20Panam%C3%A1.pdf?sequence=1>

Muñoz, D; C. Graü; I. Villalobos; H. Marval; C. Martínez; A. Zerpa. 2010. Uso de *Clostridium perfringens* como indicador de contaminación fecal en zonas de cultivo de moluscos bivalvos en el estado de sucre, Venezuela. Revista científica, fcv-luz / vol. Xx, nº 6. Obtenido de: <http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/32108/1/vete1.pdf>.

Pumna. 2000. Las aguas residuales municipales como fuentes terrestres de contaminación de la zona marino-costera en la región de américa latina y el caribe.MéxicoD.F.,México;Ramírez,O.yl.Espejel.

Rhodehamel, E; S. Harmon. 1998. Iron Milk Medium Base w/o Whole Milk is used for the presumptive test of *Clostridium perfringens* in accordance with. FDA, BAM

Ríos S; R, Agudelo; L, Gutierrez. 2017. Patógenos e indicadores microbiológicos de calidad del agua para consumo humano. www.scielo.org.co/pdf/rfnsp/v35n2/0120-386X-rfnsp-35-02-00236.pdf

Rodríguez, J. 2003. Riesgos asociados a los moluscos bivalvos. Obtenido de: <http://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/ciencia-y-tecnologia/2002/01/30/665.php>

Romero, J. 1981. Niveles actuales de contaminación coliforme en el sistema lagunar del carmen-machona, tabasco. <http://biblioweb.tic.unam.mx/cienciasdelmar/instituto/1982-1/articulo133.html>.

Saldaña, B; A. Velásquez; 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.

Sandoval, E; A. Saborío. 2007. Calidad microbiológica del agua en los sitios de recolección de conchas negras (*Anadara tuberculosa* y *Anadara similis*). Chinandega Nicaragua. Obtenido de: http://repositorio.uca.edu.ni/2555/1/2007_calidad_microbiologica_del_agua_en_sitios_de....pdf.

Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura. 2015. 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.

Smithsonian Environmental Research Center. 2013. From the Field: A Warm Welcome in Bique.

Supo, J. 2014. Análisis de la varianza de Kruskal-Wallis. Obtenido de: <http://bioestadistico.com/analisis-de-la-varianza-de-kruskal-wallis>.

APÉNDICES

Buffer de fosfato (Canadian Shellfish Sanitation Program, 2010).

Solución 1: Se disolvió 34.0 g de KH_2PO_4 (fosfato de potasio monobásico) en 500 ml de agua destilada [1N NaOH en pH 7.2].

Solución 2: Se disolvió 81.1 g de $\text{MgSO}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (sulfato de magnesio heptahidratado) en 1 L de agua destilada.

Mezcla: 1.25 ml de KH_2PO_4 + 5.0 ml de $\text{MgSO}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en 1 L de agua destilada.

Medio de sulfato ferroso y leche entera (Rhodehamel y Harmon, 1998)

Sulfato ferroso: 1 g de FeSO_4 en 50 ml de agua destilada. Se preparó una mezcla de 50 ml de sulfato ferroso en 1000 ml leche de vaca entera, esta mezcla se añadió en tubos los cuales se colocaron en baño maría, hasta llegar a una temperatura de 80°C por 1 hora.

Anexo



Figura 1. Especies colectadas en diferentes zonas de producción: a) *Anadara tuberculosa* (El Espavé), b) *Protothaca asperrima* (playa Bique), c) *Donax panamensis* (Chinina).

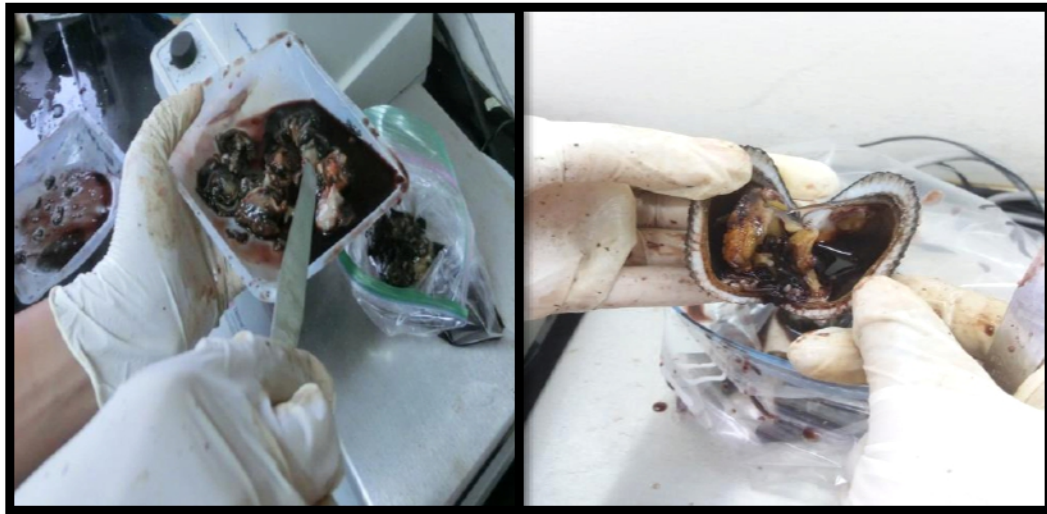


Figura 2. Extracción del cuerpo y líquido intervalvar de las tres especies bivalvas



Figura 3. Licuado de la muestra en buffer fosfato previamente esterilizado.

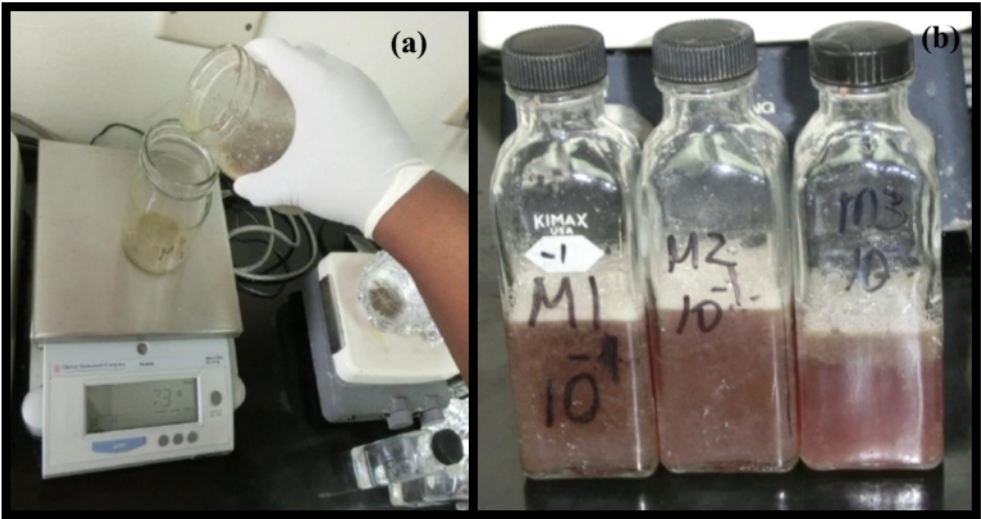


Figura 4. Procesamiento de la muestra: a) pesaje, b) dilución seriada.



Figura 5. Técnica de tubos múltiples para bacterias fermentadoras de lactosa, a) Incubación a 37°C de 24 a 48h



Figura 6. Prueba presuntiva para bacterias fermentadoras de lactosas: a) prueba negativa, b) prueba positiva (turbio y con burbujas en el Durham).



Figura 7. Tubos con medios EC MUG para cuantificar *Escherichia coli*, tubo izquierdo: Prueba Negativa, tubo derecho: Prueba Positiva para la presencia de *E. coli* (fluorescencia en presencia de luz ultravioleta).

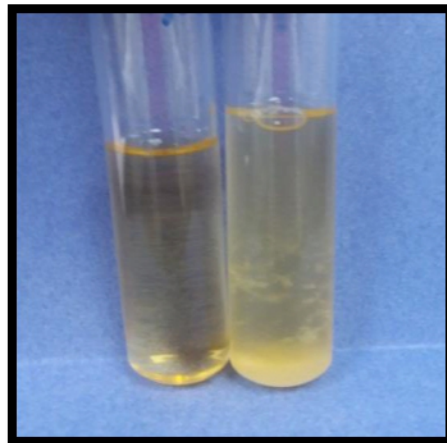


Figura 8. Técnica de tubos múltiples para *Streptococcus fecales*. Tubo izquierdo: prueba negativa, tubo derecho: Prueba Positiva (turbio y con un precipitado blanco).

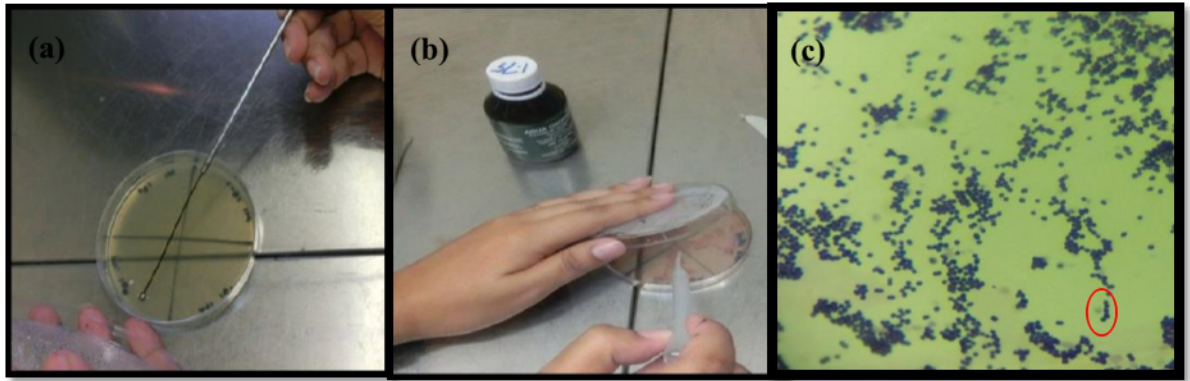


Figura 9. Prueba confirmativa para estreptococos fecales: a) Los tubos positivos se pasaron mediante estriado por dilución a platos Petri con medio m-Enterococcus Agar, b) Se consideraron como positiva aquellas colonias que resultaron negativas para la prueba de catalasa, c) resultados de colonias positivas confirmadas con la tinción de Gram.



Figura 10. Inoculación de tubos con medio que contenían sulfato ferroso y leche entera. Tubos inoculados se colocaron en baño maría a 80°C por 10 minutos.

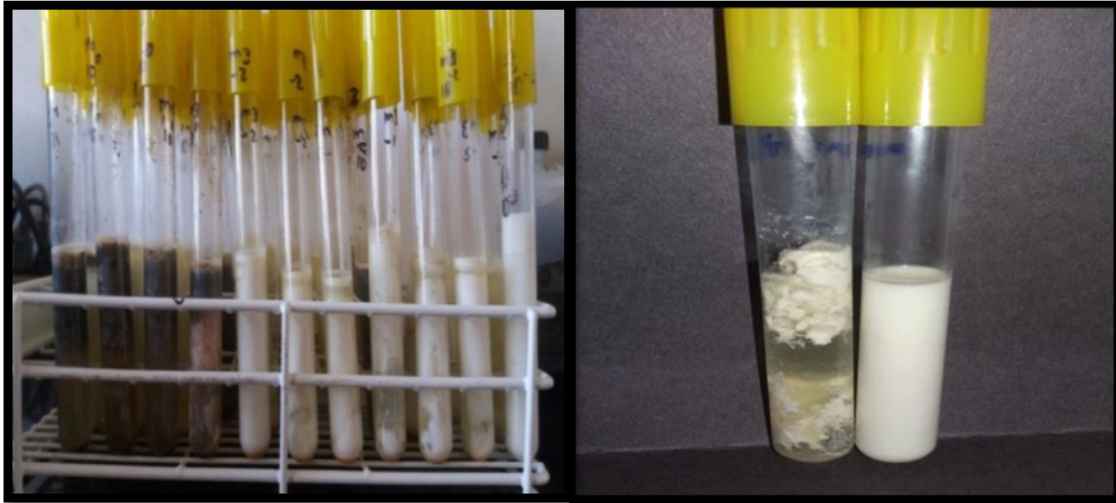


Figura 11. Técnica de tubos múltiples, para la determinación de la bacteria *Clostridium perfringens*. Tubo izquierdo prueba positiva, tubo derecho prueba negativa (presentaron leche cuajada).

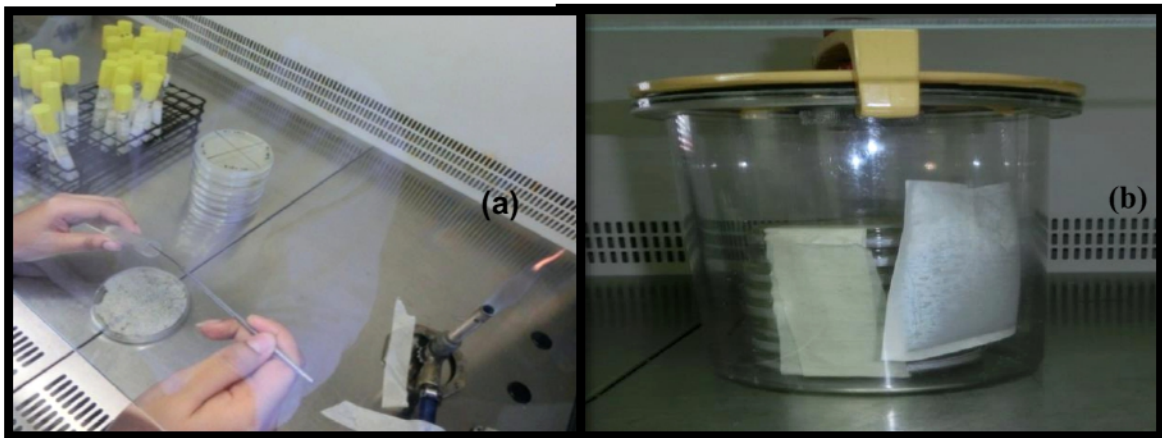


Figura 12. a) Técnica de estriación a inocular los tubos positivos, b) Sistema anaeróbico con BD GasPak™ Ez, a una temperatura de 37° C por 24 a 48 horas.

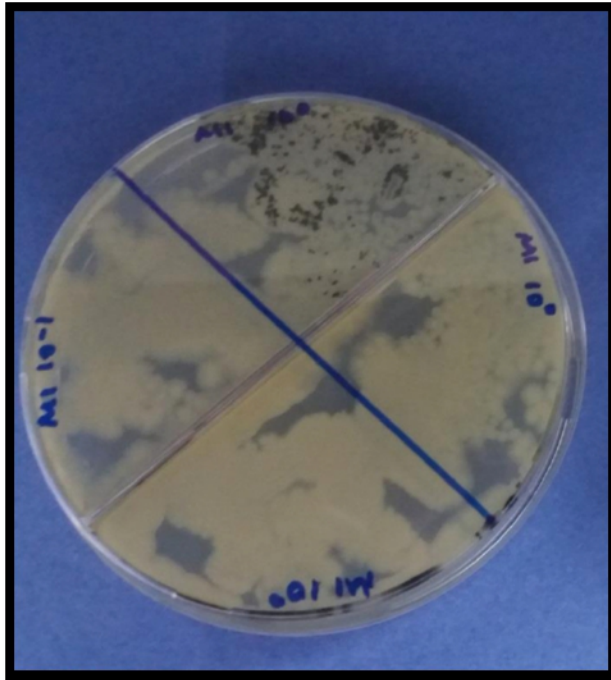


Figura 13. Prueba de Confirmación para colonias de *Clostridium perfringens* en plato petri con medio SPS. Colonias que se tornaron de color negro se tomaron como positivas para *Clostridium perfringens*.

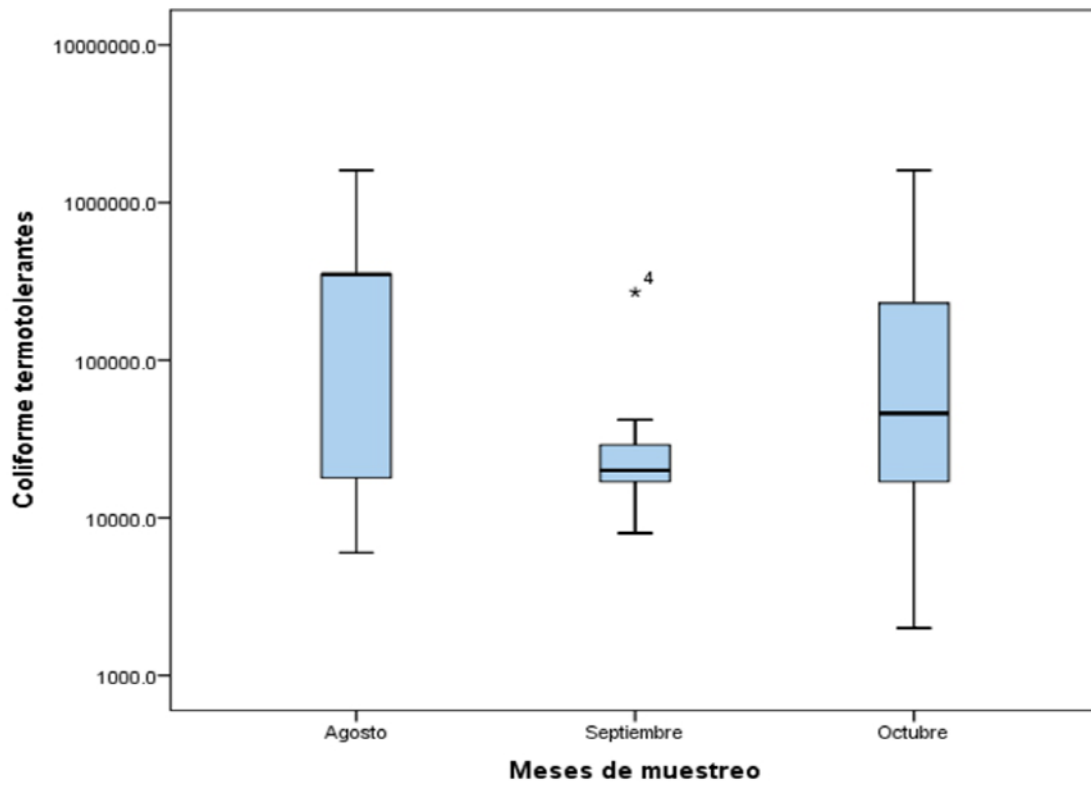


Figura 14. Distribución de coliformes termotolerantes según los meses de muestreos.

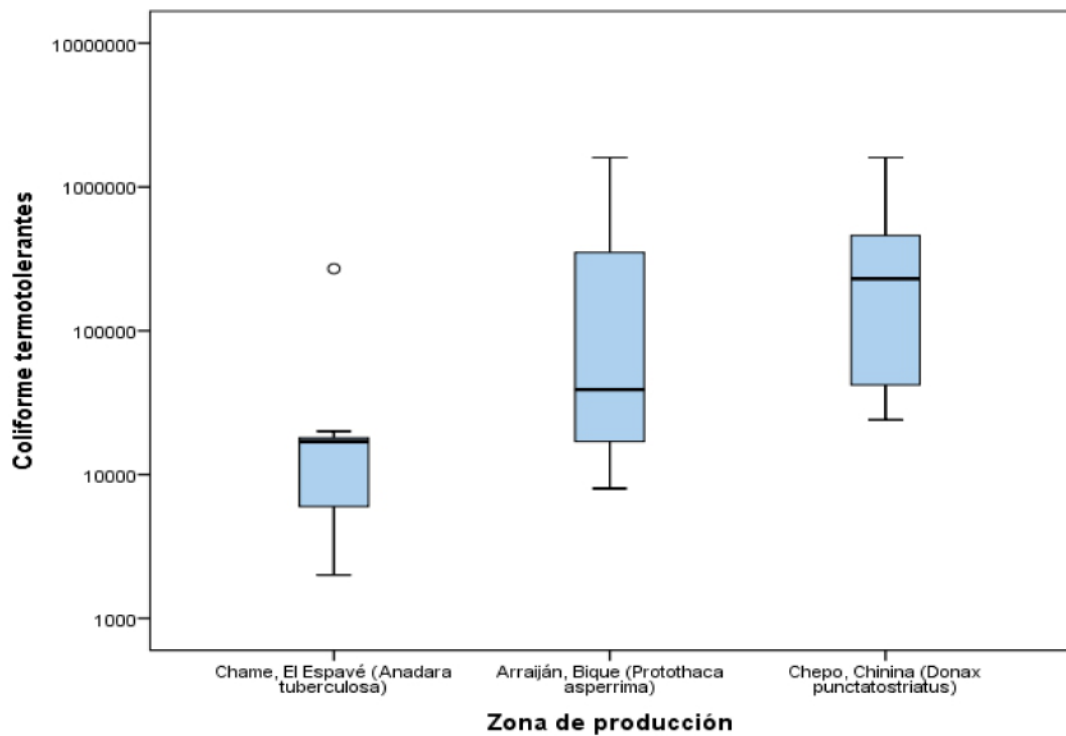


Figura 15. Distribución de coliformes termotolerantes según las zonas de producción

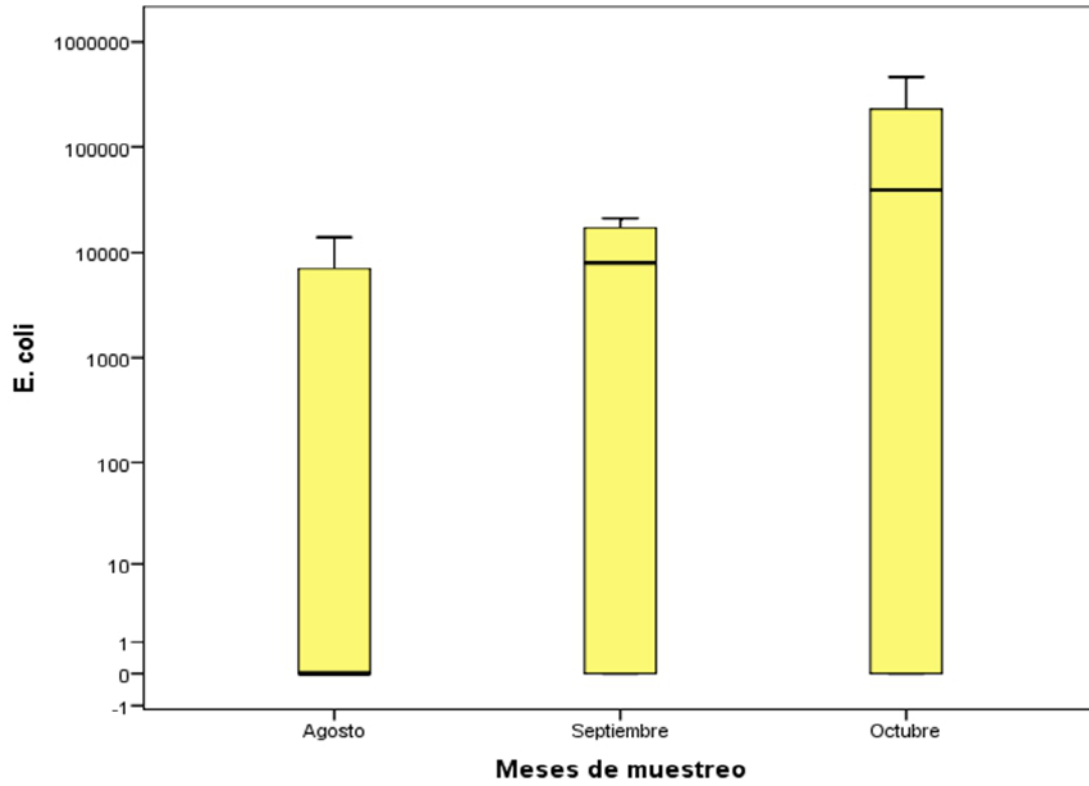


Figura 16. Distribución de *E. coli* según los meses de muestreos

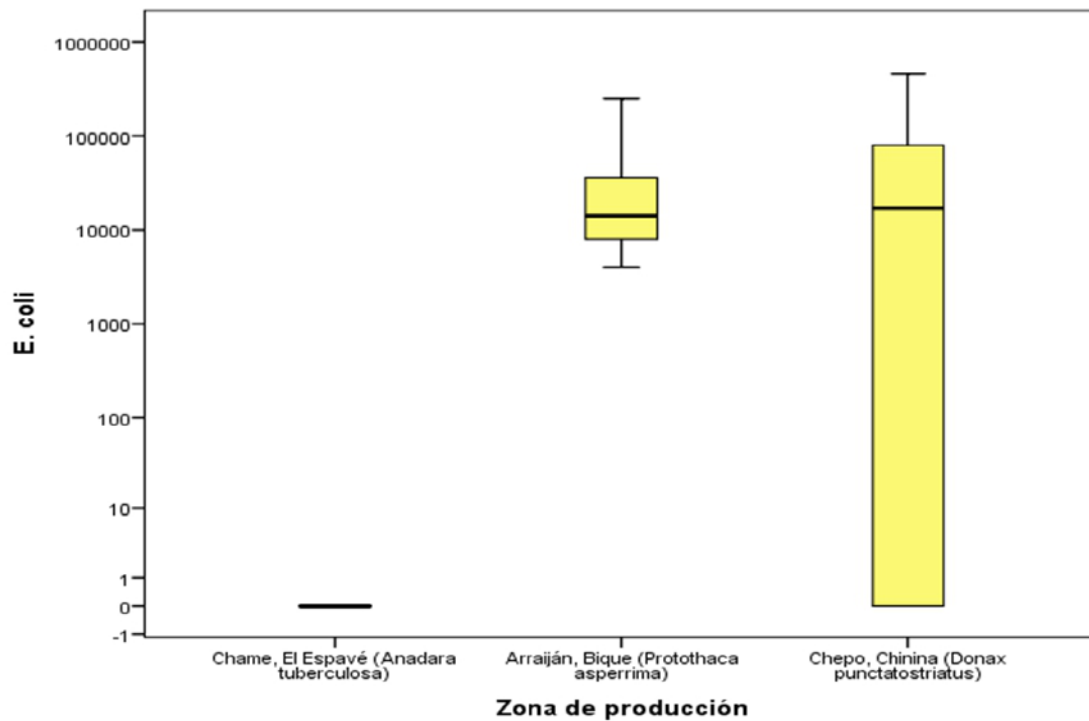


Figura 17. Distribución de *E. coli* según la zona de producción

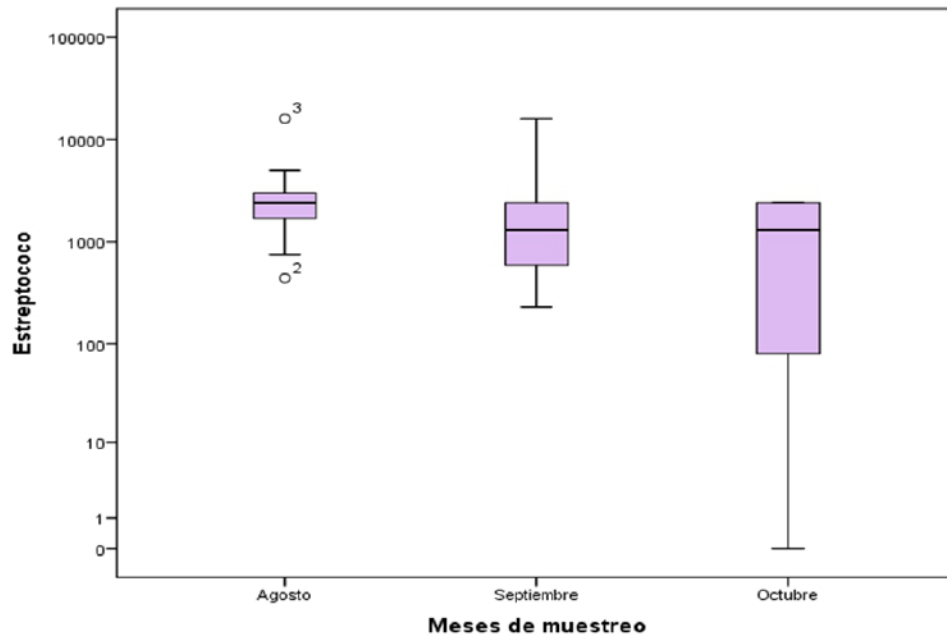


Figura 18. Distribución de estreptococos según los meses de muestreo.

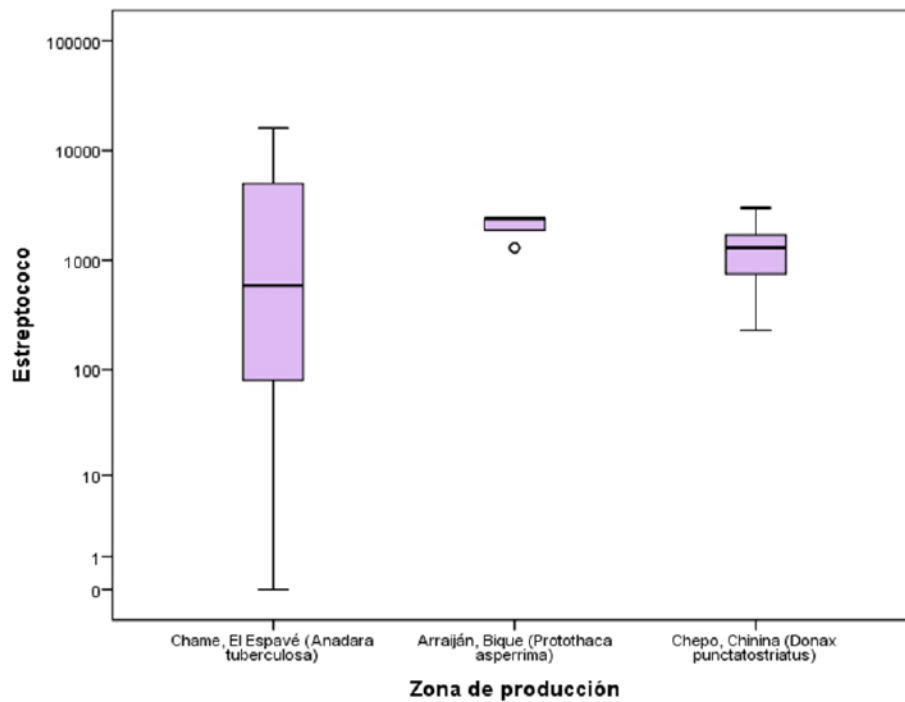


Figura 19. Distribución de estreptococos según las zonas de producción.

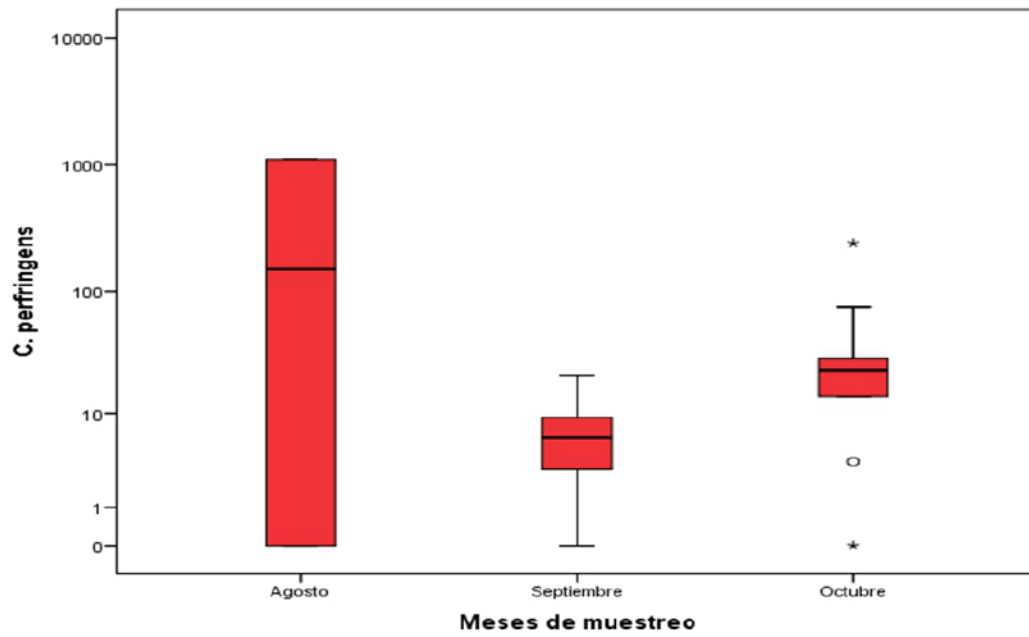


Figura 20. Distribución *C. perfringens* según los meses de muestreo.

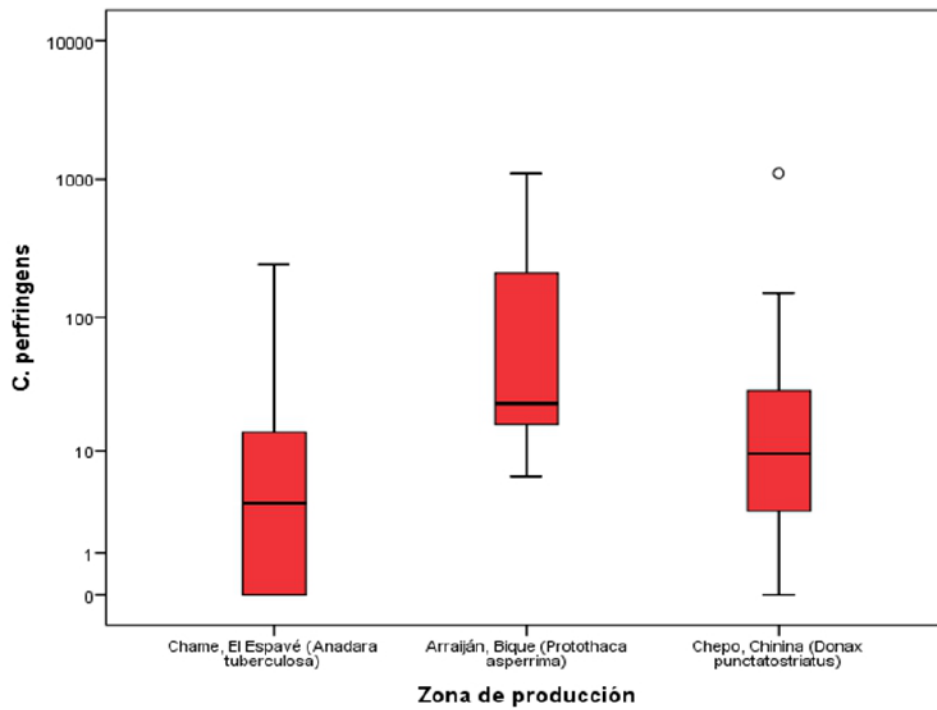


Figura 21. Distribución de *C. perfringens* según las zonas de producción.

Cuadro 1. Categoría de la Zona de Producción Según 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>P. asperrima</i>	<i>D. punctatostriatus</i>	<i>A. tuberculosa</i>	
Coliformes termotolerantes	≤ 300	≤ 6000	≤ 60000	64356.2	170951.9	14162.5	0.006
<i>Escherichia coli</i>	≤ 230	≤ 4600	≤ 46000	17675.6	1549.1	0	0.001
<i>Clostridium perfringens</i>	-	-	-	57.3	13.4	4.9	0.055
Estreptococos	-	-	-	2038.2	1042.3	515.9	0.304
ZONA DE PRODUCCIÓN				Playa Bique	Chinina	El Espavé	
CATEGORÍA DE LA ZONA DE PRODUCCIÓN				< C/C	< C/B	C/A	

Cuadro 2. Categoría del Mes de Colecta Según la Densidad de Indicadores Microbiológicos

INDICADORES MICROBIOLÓGICOS	CATEGORÍAS DE LA NORMA TÉCNICA DE LA UNIÓN EUROPEA (NMP/100 gr)			MEDIAS GEOMÉTRICAS DE LA DENSIDAD DE INDICADORES MICROBIOLÓGICOS POR MES DE COLECTA (NMP / 100 gr)			VALOR DE <i>p</i>
	A	B	C	Agosto	Septiembre	Octubre	
Coliformes termotolerantes	≤ 300	≤ 6000	≤ 60000	116912.3	25142.2	53007.8	0.244
<i>Escherichia coli</i>	≤ 230	≤ 4600	≤ 46000	21.2	530.0	2431.5	0.043
<i>Clostridium perfringens</i>	-	-	-	41.9	4.8	18.6	0.137
Estreptococos	-	-	-	2308.4	1293.9	366.4	0.152
CATEGORÍA DE LA FECHA DE COLECTA				< C/A	C/B	C/B	