



UNIVERSIDAD DE PANAMÁ

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y TECNOLOGÍA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

Evaluación microbiológica del proceso de depuración de moluscos bivalvos

POR:

Boris Chong

Trabajo de Graduación presentado como requisito para optar por el título de Licenciatura en Biología con orientación en Microbiología y Parasitología.

PANAMÁ, REPÚBLICA DE PANAMÁ

2020



TRIBUNAL EXAMINADOR

Título:

Evaluación microbiológica del proceso de depuración de moluscos bivalvos

Por:

Boris Chong 8-850-2279

Tesis presentada a consideración de la Escuela de Biología como requisito parcial para optar por el título de Licenciatura en Biología con Orientación en Microbiología y Parasitología.

Asesor: Mgter. Humberto Cornejo

Asesor: Mgter. Fermín Mejía

Asesor: Dr. Alex O. Martínez Torres

Dedicatorias

Dedico este trabajo a mis padres, Mariela Mudarra y Félix Chong, ya que con su apoyo incondicional y consejos, sobre esfuerzo y superación me encuentro frente a ustedes presentándoles mi trabajo de graduación, y con mucho orgullo agradeciéndole por cada etapa en la cual me han acompañado en las decisiones que he tomado, a cada uno de mis familiares, amigos gracias por estar conmigo en esta etapa de superación.

Gracias a todos.

Boris Chong

AGRADECIMIENTOS

Agradecerle a Dios por permitirme culminar con éxito esta etapa de mi vida, por iluminarme y guiar mis pasos y decisiones que he tomado durante este proceso de estudios universitarios, a mis padres por ser mi fortaleza y guías para dar cada paso con sabiduría.

A mis compañeros y familiares, que de una forma u otra se vieron involucrados en este largo proceso.

A mis Profesores asesores, Prof. Humberto Cornejo, al Prof. Alex O. Martínez Torres y al Prof. Fermín Mejía, a ustedes muchas gracias por los conocimientos brindados durante estos años de universidad y por el apoyo que me brindaron en la realización de este proyecto, también le agradezco enormemente a la Mgter. Marisela Castillo por el apoyo brindado en los análisis estadísticos en este proyecto.

Agradecerle enormemente a la Autoridad de Recursos Acuáticos de Panamá (ARAP), por permitirme realizar este proyecto en esta institución, por el financiamiento del proyecto y por brindarme el uso de las instalaciones y laboratorios de Molusco y Equinodermos, así como el laboratorio de análisis microbiológicos de la Estación de Maricultura del Pacífico, situada en Vacamonte, y que pertenece a dicha institución. A mi asesora la Lic. Diana Pérez gracias por todo el apoyo, enseñanzas y consejos aplicados dentro de este proyecto, al Ing. Nelson Collado, la Lic. Laura Molina, la estudiante Andreina Hernández y al Técnico Fabián Valdés, a este excelente grupo de trabajo que ahora es mi familia gracias por todo.

Boris Chong

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL

Resumen.....	1
Abstract.....	4
Introducción.....	6
Objetivos:	
Objetivos generales.....	9
Objetivos específicos.....	9
Capítulo I: Revisión bibliográfica:	
1. Planteamiento del problema.....	12
1.2 Antecedentes.....	14
1.3 Justificación.....	17
1.4 Marco teórico.....	19
1.5 Bacterias marinas.....	22
1.6 Los <i>Coliformes</i> como organismos indicadores de contaminación.....	22
1.7 Microorganismos patógenos (<i>Salmonella spp</i>).....	22
1.7.1 <i>Vibrio spp</i>	23
1.7.2 <i>E. coli</i>	23
1.8 Otras bacterias (<i>Pseudomonas spp</i>).....	24
1.9 Zona de producción y captura de concha negra.....	24
1.10 Clasificación de las zonas de producción.....	25
1.11 Criterios microbiológicos del molusco de las zonas de producción (músculo y líquido-inter-valvar).....	25
Capítulo II: Metodología:	
2. Metodología.....	27
2.1 Determinación de <i>Coliformes</i> totales y <i>E. coli</i> por el método de tecnología de sustrato definido (muestras de agua).....	28
2.2 <i>Salmonella</i> (pre-enriquecimiento).....	29
2.2.1 Enriquecimiento selectivo.....	30

2.2.2 Aislamiento diferencial.....	30
2.3 <i>Vibrio cholerae</i> (enriquecimiento).....	30
2.3.1 Aislamiento selectivo.....	30
2.4 <i>Staphylococcus aureus</i> (aislamiento y enriquecimiento).....	31
2.5 <i>Mesófilos aerobios</i>	31
2.6 Bacterias <i>Coliformes</i> y <i>E. coli</i> (en bivalvos, prueba presuntiva).....	32
Capítulo III Resultados y discusión:	
Resultados.....	33
Discusión.....	38
Capítulo IV Conclusiones y Recomendaciones:	
Conclusiones.....	41
Recomendaciones.....	42
Capítulo V Referencias bibliográficas y anexos:	
Referencias bibliográficas.....	44
Anexos.....	52

ÍNDICE DE GRÁFICO, CUADROS Y FIGURAS

ÍNDICE DE GRÁFICO

Grafico 1. Distribución de UFC entre las categorías de mes.....	53
Grafico 2. Distribución de UFC entre las categorías de sitio.....	54
Grafico 3. Distribución de UFC entre las categorías de indicador.....	55
Grafico 4. Distribución de UFC entre las categorías de indicador y las horas del tratamiento.....	56
Grafico 5. Distribución de UFC entre las categorías de tratamiento.....	57
6. Comparación de los indicadores Coliformes totales, <i>E. coli</i> y <i>Enterococos</i> entre los tratamientos cada 12 h.....	58
Grafico 7. Distribución de las UFC entre las categorías de tratamiento.....	59

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Resumen del NMP de muestras de agua durante el proceso de depuración.....	60
Cuadro 2. Resumen de UFC/mL en carne de Moluscos Bivalvos (<i>Anadara spp</i>)...61	

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de zona manglar de Coto en el Espavé de Chame.....	62
Figura 2. Georreferencia de los sitios de extracción en el Espavé de Chame.....	62
Figura 3. Zona de producción del Espavé de Chame.....	63
Figura 4. Sistema de toma y filtración de agua de mar en la Estación de Maricultura del Pacífico.....	63
Figura 5. Sistema de depuración.....	63
Figura 6. Esquema del sistema de depuración (tinas y flujo de agua de mar)....	64
Figura 7. Sistema del flujo de agua y aireación durante el proceso de depuración.....	65
Figura 8. Calibración del flujo continuo de agua del sistema de depuración.....	65

Figura 9. Muestras de concha negra recién capturadas.....	66
Figura 10. Captura desde coto sitio de extracción.....	66
Figura 11. Conteo e inspección de las condiciones de las conchas negras.....	67
Figura 12. Limpieza de conchas negras previo al inicio de los procesos de depuración.....	67
Figura 13. Selección y organización de concha negra por tina para inicio del proceso de depuración.....	67
Figura 14. Obtención de tejido y líquido-inter-valvar para los diferentes análisis microbiológicos.....	68
Figura 15. Bandejas Quanti-Tray para detectar <i>Coliformes</i> totales en tinas de depuración.....	68
Figura 16. Bandejas Quanti-Tray para detectar <i>E. coli</i> en tinas de depuración...	69
Figura 17. Bandejas Quanti-Tray con muestra de agua y Enterolert para detectar enterococos en tinas de depuración.....	69
Figura 18. Medios selectivos para determinar UFC/mL en carne de Moluscos Bivalvos (<i>Anadara</i> spp).....	70
Figura 19. Agar TCBS con presuntas colonias de <i>Vibrio</i>	70
Figura 20. TSI Y LIA para presuntas muestras de <i>Vibrio</i> y <i>Salmonella</i>	71
Figura 21. Pruebas bioquímicas API20E para presuntas muestras de <i>Vibrio</i> y <i>Salmonella</i>	71
Figura 22. Prueba API 20E presunto positivo para <i>E. coli</i>	72
Figura 23. Prueba API 20E presunto positivo para <i>Enterobacter cloacae</i>	72
Figura 24. Criterio clasificación de zonas de producción y recolección de moluscos del programa sanitario nacional de los Estados Unidos (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Depuración de bivalvos: aspectos fundamentales y prácticos. 2010. Roma: FAO. 12p.....	73

RESUMEN

RESUMEN

La depuración o purificación, es un proceso que consiste en mantener a los moluscos en tanques de agua de mar limpia, en condiciones que permitan maximizar la actividad natural de filtración y expulsar así el contenido intestinal. De esta manera, se potencia la separación de los contaminantes expulsados de los moluscos bivalvos y se impide que se re-contaminen. Al principio, la depuración se desarrolló como una medida, entre muchas, para abordar el problema de numerosos brotes de fiebre tifoidea relacionados con el consumo de moluscos (causada por la bacteria *Salmonella typhi*), que provocó enfermedades y muertes a finales del siglo XIX y a principios del siglo XX, en muchos países de Europa y de Estados Unidos de América (EEUU) (Davies, 2010).

Se ha observado que la depuración no es efectiva para reducir la carga en algunas especies de *Vibrio* patógenos para el hombre. Existe la preocupación de un aumento de la concentración de *Vibrios* durante el ciclo de depuración, cuando la salinidad se encuentra en el rango adecuado (p. ej. 10 a 30 partes por millón (ppm) y la temperatura es suficientemente alta (p. ej. superior a los 20°C) (West, 2010).

Se realizaron cuatro muestreos y recolección de aguas para análisis microbiológicos en distintos puntos denominados coto, dentro de los cuales se situaron cinco puntos distintos, en una zona de estero, ubicada en el sector del Espavé de Chame, así mismo se recolectaron los organismos para los distintos análisis microbiológicos. Las cinco muestras de agua y de organismos (*Anadara* spp / 450), fueron transportadas a los laboratorios de moluscos y equinodermos, y laboratorio de análisis microbiológicos de la estación de Maricultura del Pacífico (EMP), de la Autoridad de Recursos Acuáticos de Panamá (ARAP), en cadena de frío. Luego, se realizaron métodos de diluciones seriadas y se analizaron con los Kit de detección Colillert y Enterollert (IDEXX, Westbrook, Estados Unidos de América), para determinar la carga de *Coliformes* totales y

E. coli, y *Enterococos*, respectivamente, mediante la técnica de sustrato específico, Quanti Tray, aislamientos de cepas específicas en Platos Petri con medios selectivos, así como en tubos inclinados para cepas puras y finalmente, se realizaron las pruebas de identificación bioquímica API20E para la confirmación de género y especie.

Las muestras analizadas mediante los análisis estadísticos de Kruskal-Wallis, para muestras no paramétricas y con un significancia mayor o menor a 0.5, indicaron que no hay diferencias significativas entre los microorganismos analizados y su distribución por lo tanto el proceso de eficacia en la depuración no fue efectivo, siendo así se puede decir que, el modelo o plan piloto para la depuración no funciono adecuadamente.

ABSTRACT

Depurification or purification is a process that consists in keeping the molluscs in clean seawater tanks, in conditions that allow to maximize the natural activity of filtration and thus expel the intestinal contents. In this way, the separation of the pollutants expelled from bivalve molluscs is strengthened and prevented from re-contamination. At first, purification was developed as a measure, among many, to address the problem of numerous typhoid fever outbreaks related to the consumption of mollusks (caused by *Salmonella typhi* bacteria), which caused disease and death in the late 19th and early 20th century, in many countries in Europe and the United States of America (USA) (Davies, 2010).

It has been observed that purification is not effective in reducing the load on some species of *Vibrio* pathogens for man. There is concern about an increase in the concentration of *Vibrios* during the purification cycle, when salinity is in the appropriate range (e.g. 10 to 30 parts per million (ppm) and the temperature is sufficiently high (e.g. above 20°C) (West, 2010).

Four Sampling and collection of water for microbiological analysis were carried out at different points called coto, within which five different points were located, in an estuary area, located in the sector of Espave de Chame, organisms were also collected for the various microbiological analyses. The five samples of water and organisms (*Anadara* spp/450), were transported to the laboratories of mollusks and echinoderms and laboratory of microbiological analysis of the Pacific Mariculture Station (EMP), of the Authority of Aquatic Resources of Panama (ARAP), in cold chain.

Serial dilution methods, Colillert and Enterollert (IDEXX, Westbrook, United States of America), were then performed to determine the load of total coliforms and *E.coli* and enterococci using the Tray Quanti technique, Insulations in Petri Plates with selective media, as well as tubes respectively and finally carried out the biochemical identification tests API20E for confirmation of genero and species.

The samples analyzed using the Kruskal-Wallis statistical analyzes, for non-parametric samples and with a significance greater or less than 0.5, indicated that

there are no significant differences between the analyzed microorganisms and their distribution, therefore, the process of efficacy in the purification does not It was effective, so it can be said that the model or pilot plan for the debugging did not work properly.

INTRODUCCIÓN

La producción y consumo mundial de moluscos bivalvos ha aumentado de manera significativa durante los últimos años, pasando de un total de acuicultura y captura de aproximadamente 10,7 millones de toneladas en 1999 a 14 millones de toneladas en 2006 (FAO-Estadísticas de Pesca). Asimismo, el desarrollo del transporte aéreo y marítimo, y de las técnicas de conservación ha permitido a los consumidores de las diferentes partes del mundo disfrutar del consumo de moluscos bivalvos producidos en aguas remotas. Tales avances en la distribución y en el comercio han supuesto a su vez nuevos retos para la protección de los consumidores, particularmente en lo que se refiere a la inocuidad de los bivalvos relacionada con la ausencia de microorganismos patógenos. Varias especies de moluscos bivalvos se consumen preferentemente crudas o vivas (ej. ostras) o poco cocinadas (ej. mejillones), lo que los convierte en una categoría de alimento de alto riesgo que requiere medidas de control adecuadas para eliminar o reducir a niveles aceptables los riesgos biológicos, químicos y físicos. Además, la distribución de productos crudos congelados ha alargado en gran medida el período en el que se podrían consumir lotes contaminados (FAO, 2010).

Si bien es cierto que 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, hay que señalar que las aguas de cultivo de moluscos que realmente están sin contaminar son muy escasas. La producción de moluscos en zonas con niveles relativamente bajos de contaminación, seguida de la depuración asegurará un nivel de riesgo de enfermedades por contaminación fecal tan bajo como el que se consigue a través del cocinado. Este proceso permite eliminar los contaminantes microbianos de los moluscos bivalvos ligera o moderadamente contaminados y por lo tanto, incrementa la disponibilidad y suministro de moluscos bivalvos nutritivos y seguros. También, permite a la industria cumplir con los requisitos legales de muchos países que exigen la depuración de moluscos bivalvos en circunstancias específicas (FAO, 2010).

La depuración es una forma efectiva de eliminar muchas bacterias fecales contaminantes de los moluscos bivalvos, pero según las prácticas comerciales

actuales, es menos efectiva en la eliminación de contaminantes como el norovirus y el virus de la hepatitis A. No tiene una eficacia constante, o no es efectiva, en la eliminación de otros contaminantes como los vibrios marinos naturales (p. ej. *Vibrio parahaemolyticus* o *Vibrio vulnificus*), biotoxinas marinas [como las que provocan la toxina paralizante de los moluscos (PSP), la toxina diarreica de los moluscos (DSP) o la toxina amnésica de los moluscos (ASP)], metales pesados o sustancias químicas orgánicas (Jackson y Ogburn, 2010).

Una depuración efectiva requiere que los moluscos se manipulen adecuadamente durante la recolección, el transporte y el almacenamiento previo a la depuración. Asimismo, se requiere un diseño y funcionamiento adecuados para cumplir los requisitos identificados anteriormente para la eliminación y separación de contaminantes. De la misma manera, las instalaciones de estos sistemas deben funcionar manteniendo unos buenos niveles de higiene alimentaria para prevenir contaminaciones cruzadas entre los distintos lotes de moluscos o una recontaminación de los mismos (Jackson y Ogburn, 2010).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Objetivo general:

- Evaluar la calidad microbiológica de los moluscos bivalvos expuestos a diferentes tratamientos de depuración.

Objetivos específicos:

- Evaluar la calidad microbiológica del agua en el área de extracción de los moluscos bivalvos, mediante recuento total de bacterias y el uso de Colillert y Enterollert (IDEXX, Westbrook, Estados Unidos de América), y determinar la carga de coliformes totales y *E. coli* y *Enterococos* mediante la técnica de Quanti Tray.
- Comparar la calidad microbiológica de los moluscos bivalvos (organismo incluyendo líquido-intervalvar), antes y después del proceso de depuración, mediante la determinación de *Mesófilos* aerobios, *Coliformes* totales, *Pseudomonas* y *Estafilococos*.
- Interpretar los resultados mediante técnicas bioestadísticas (Kruskall-Wallis para muestras independientes).

CAPITULO I: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La contaminación marina y su marcada influencia en la salud de los ecosistemas costeros, está estrechamente relacionada con el vertiginoso crecimiento demográfico e industrial, y con ello, el incremento de las actividades domésticas, agrícolas e industriales que se generan, incrementándose la cantidad y tipo de residuos que llegan al mar con un inadecuado control, situación que ha sobrepasado la capacidad depuradora y conduciendo a la degradación de muchos ambientes marino costeros (Davies, 2012; Garay, 2012; Marín, 2012).

Los principales factores que contribuyen a la contaminación de las aguas superficiales en las zonas costeras incluyen: la gran cantidad de desechos de pesquerías derramados al mar, vertederos de aguas residuales, descargas de residuos tóxicos y peligrosos, residuos sólidos urbanos, que producen contaminación difusa por escorrentías y lixiviación, además, de los proyectos turísticos adyacentes a estuarios, con la adición elevada de contaminación bacteriana (Canter, 2012; Dalsgaard y Thamdrum, 2012).

Cuando los moluscos bivalvos crecen en medios contaminados, presentan altos recuentos de indicadores microbiológicos como los coliformes termotolerantes y *E. coli*, por lo que se requiere de métodos adecuados de depuración que permitan disminuir estas concentraciones. En líneas generales, la depuración es un proceso en el que se trata de reducir la carga bacteriana de los moluscos a un nivel aceptable, que no represente un riesgo para la salud pública al ser consumidos crudos o parcialmente cocidos (Blogoslawski, 2012). La purificación controlada de los tejidos de los moluscos con luz ultravioleta (UV), es utilizada extensivamente a nivel mundial y ha sido asociada con la disminución de enfermedades transmitidas por el consumo de moluscos contaminados con bacterias. Al respecto, diversos estudios han demostrado una rápida y eficiente tasa de reducción de las bacterias hasta niveles no detectables dentro de aproximadamente 48 h de depuración con irradiación de UV (Doré y Lees, 2012). La desinfección por radiación UV, es un

procedimiento físico que no altera la composición química, sabor ni olor de los moluscos, constituyendo una alternativa segura y eficaz frente a otros métodos de desinfección, como la cloración y el ozono, que generan subproductos como trihalometanos (THM) y bromatos, que son considerados cancerígenos (Rodríguez *et al.*, 2012). La radiación UV de 250 – 270 nm, constituye la franja del espectro electromagnético considerada germicida y su utilización conlleva a la inactivación del microorganismo (Oguma, 2012).

Desde los años ochenta, diversos autores han trabajado con éxito en la depuración bacteriana (*E. coli*, *Salmonella* sp., estreptococos fecales, *Vibrio* sp., etc.) de especies de bivalvos tales como los mejillones (*Perna viridis*, *Mytilus edulis* y *M. galloprovincialis*) y las ostras (*Crassostrea belcheri*, *C. gigas* y *C. virginica*) en países asiáticos, europeos y del continente americano (Sangrungruang, 2012; Power y Collins, 2012; Mesquita, 2012; Doré y Lees, 2012; Harris, 2012 y Croci, 2012).

1.2. ANTECEDENTES

La depuración o purificación, es un proceso que consiste en mantener a los moluscos en tanques de agua de mar limpia, en condiciones que permitan maximizar la actividad natural de filtración y expulsar así el contenido intestinal. De esta manera, se potencia la separación de los contaminantes expulsados de los moluscos bivalvos y se impide que se re-contaminen. Al principio, la depuración se desarrolló como una medida, entre muchas, para abordar el problema de numerosos brotes de fiebre tifoidea relacionados con el consumo de moluscos (causada por la bacteria *Salmonella typhi*), que provocó enfermedades y muertes a finales del siglo XIX y a principios del siglo XX, en muchos países de Europa y de Estados Unidos de América (EEUU) (Davies, 2010).

Se ha observado que la depuración no es efectiva para reducir la carga en algunas especies de *Vibrio* patógenos para el hombre. Existe la preocupación de un aumento de la concentración de *Vibrios* durante el ciclo de depuración, cuando la salinidad se encuentra en el rango adecuado (ej. 10 a 30 partes por millón (ppm) y la temperatura es suficientemente alta (ej. superior a los 20°C) (West, 2010).

Los tratamientos térmicos, aunque garantizan la salubridad del producto, no son aplicables a los moluscos bivalvos que se comercializan vivos. En este caso, se opta, si la legislación así lo permite, por prolongar el proceso natural de filtración y de esta forma, eliminar una parte considerable de los microorganismos contaminantes, proceso que recibe el nombre de depuración de moluscos bivalvos. Considerando que este proceso se realice en el mar o en centros especializados, se distinguen dos tipos de depuración: la depuración natural o reinstalación y la depuración controlada (West, 2010).

La reinstalación consiste en trasladar los moluscos bivalvos vivos a zonas marítimas, laguneras o de estuario autorizado, claramente delimitado y señalizado por boyas, postes o cualquier otro tipo de material fijo, durante el tiempo necesario para la eliminación de contaminantes de origen microbiano. Al no variar el hábitat, evitando así el estrés que supone la depuración controlada, este método ofrece

ventajas de una mayor rapidez y eficacia, así como, la posibilidad de prolongar el tiempo de depuración. De esta forma, la reinstalación es apropiada para tratar moluscos bivalvos muy contaminados que necesiten un mayor tiempo de depuración (la legislación específica un mínimo de dos meses para aquellos provenientes de zonas muy contaminadas (<60000 coliformes fecales/100 g en todas las muestras). Los principales inconvenientes de la depuración natural son la limitada disponibilidad de zonas costeras limpias, la dificultad de obtención de derechos de propiedad, la imposibilidad de controlar la calidad del agua (contaminaciones ocasionales) y otros parámetros del agua de mar, así como una mayor vulnerabilidad a la sustracción ilegal (Cuña Casasbellas, 2014).

La eficacia del proceso de depuración depende de factores relacionados con el estado fisiológico del molusco (fase de desove/post-desove); de las características de las instalaciones (longitud de los estanques, caudal y circulación del agua) y de los parámetros físico-químicos del agua utilizada (temperatura, salinidad, concentración de oxígeno disuelto, turbidez). En relación a estos últimos, las condiciones óptimas son: temperatura comprendida entre 14-18°C; salinidad superior al 30‰; concentración de oxígeno disuelto mayor de 5,5 g/l y agua ligeramente turbia (máximo 70 mg/L). Además, las condiciones de extracción, manipulación y transporte de los moluscos repercuten en su capacidad de filtración y por tanto, en el proceso de depuración. En condiciones adecuadas, la velocidad de eliminación de microorganismos contaminantes se ajusta a una curva exponencial, reduciéndose los niveles de bacterias patógenas en un 90-95% transcurridas 24 h, incluso en el caso de moluscos con altos niveles de contaminación (Cuña-Casasbellas, 2014).

Los estudios sobre la eliminación de bacterias durante la depuración usando bivalvos inoculados experimentalmente con cultivos bacterianos suelen mostrar un mayor grado de eliminación que los estudios que usan moluscos contaminados de forma natural. La utilización de esta técnica de inoculación en los estudios sobre los criterios de depuración o de la validación de la efectividad de los sistemas comerciales es por tanto cuestionable (Cantelmo y Carter, 2010).

En un contexto mundial, 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 lluvia (Otwell, 2010).

La contaminación de bacterias y virus en las zonas de cría determina, por tanto, el tratamiento al que deben someterse los moluscos bivalvos con el fin de eliminar o reducir estos riesgos antes de su consumo. Muchos de estos patógenos, como los virus que provocan gastroenteritis y hepatitis infecciosa o las bacterias que causan fiebre tifoidea u otras patologías, están relacionados normalmente con una contaminación por aguas residuales fecales humanas. Otros, como las bacterias que causan gastroenteritis (*Salmonella* y *Campylobacter* no tifoideas), pueden estar asociados a aguas contaminadas por heces humanas o animales y estas últimas, también pueden contaminar las zonas de cultivo de moluscos a través de las escorrentías en los períodos de lluvia (Otwell, 2010).

1.3. JUSTIFICACIÓN

La contaminación del mar se define como la introducción por el hombre en forma directa o indirecta, de sustancias o de energía, dentro del ambiente marino (Carney, 2010). Con el resultado de efectos nocivos tales como: perjuicios para los recursos vivos, peligro para la salud humana, obstáculos para las actividades marinas (incluidas la pesca), empeoramiento de la calidad para el empleo del agua de mar y reducción de las posibilidades de esparcimiento. La preocupación por la contaminación del medio marino ha aumentado constantemente en los últimos años (Smith, 2010).

La descarga de aguas residuales de tipo doméstica en zonas costeras es una práctica común en muchas partes del mundo y esto trae como consecuencia un deterioro de la calidad de la misma. Las aguas residuales descargadas al mar contienen concentraciones importantes de microorganismos patógenos, entre ellos bacterias coliformes, Streptococos, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, y además, de virus entéricos (Carney, 2010; Sayler, 2010; Shuval, 2010; Orozco-Borbón, 2010; Papapetropoulou y Rodopoulou, 2010).

Con el fin de obtener información sistemática de los diversos sistemas acuáticos que sostienen este recurso alimenticio tan importante, desde hace varias décadas se han empleado coliformes y estreptococos fecales como indicadores de la posible presencia de bacterias patógenas asociadas con la contaminación fecal (Cohen y Shuval 2010; Smith, 2010; Carney, 2010).

El daño a los organismos y a los ecosistemas marinos, los peligros para la salud humana por contacto directo con el agua contaminada y por el consumo de alimentos de origen marino contaminados, y la destrucción de la belleza de la costa, son algunos de los diversos efectos (Arizpe, 2010).

El tratamiento del agua de mar utilizada es de vital importancia para un óptimo desarrollo de los cultivos y su posterior depuración. Para el cultivo óptimo y la

depuración de los moluscos bivalvos es necesario que el agua pase por un proceso de tratamiento. Este tratamiento remueve materia particulada, protozoarios, bacterias y ciertos metales disueltos. El tratamiento puede ser simple o complejo dependiendo de la fuente de agua utilizada (Carpenter, 2012).

Para evaluar la calidad sanitaria del molusco depurado es necesario utilizar de manera conjunta indicadores tales como *E. coli* y los estreptococos fecales. En particular, es conveniente utilizar las bacterias fecales para supervisar la respuesta de los bivalvos durante el tratamiento de depuración. Una reducción del promedio de los indicadores bacterianos fecales en los moluscos puede proporcionar una evidencia inequívoca del éxito del tratamiento de depuración (Mesquita, 2012). Herrera y Suárez (2012), señalan que la *E. coli* y los estreptococos son los indicadores apropiados para determinar la presencia de contaminación de origen fecal, dado que su nicho ecológico habitual es el intestino de los seres humanos y otros animales.

La premisa de considerar que al momento de cultivar bivalvos en áreas costeras, existe una alta probabilidad de exposición de estos organismos a contaminación por aguas residuales, un factor implicado en la transmisión de enfermedades entéricas por su alto contenido de bacterias, parásitos, virus y toxinas con potencial patogénico. Esto podría conllevar a problemas sanitarios, si se toma en cuenta la naturaleza biofiltradora de los moluscos y su capacidad de concentrar microorganismos por un largo periodo de tiempo (Rippey, 2012).

1.4. MARCO TEÓRICO

Los bivalvos son acarreadores potenciales de microorganismos patógenos (virus y bacterias), como consecuencia de su mecanismo de alimentación por filtración, por medio del cual son capaces de concentrar aquellos microorganismos presentes en su hábitat natural (Madden, 2012). Por lo tanto, al igual que para otros bivalvos, hay una relación estrecha entre su calidad microbiológica y la calidad de las aguas en que viven (Fernández, 2012).

Dado que las conchas se encuentran altamente contaminadas y se consumen normalmente crudas, estas constituyen una fuente potencial de enfermedad para la población, y por lo tanto, resulta muy importante estudiar alternativas que permitan mejorar la calidad microbiológica de estos mariscos. Una de ellas, es la depuración microbiológica, que consiste en un método que se utiliza ampliamente en países que cultivan moluscos a gran escala, con el fin de mejorar su calidad sanitaria si han sido cosechados en zonas contaminadas (Cantelmo y Carter, 2012).

En los métodos de depuración existentes, los bivalvos son colocados en tanques limpios con una fuerte circulación continua de agua tratada, que al ser filtrada por los organismos permite la expulsión de la contaminación por arrastre (Blagoslawski, 2012).

Este proceso requiere de equipo especializado de alto costo, pues para tratar el agua y lograr eliminar la contaminación en ella, se utilizan filtros de ozono, filtros de cloro, rayos ultravioleta u otros agentes, además de las instalaciones necesarias para lograr un sistema continuo (Blagoslawski, 2012). Como se deduce, estas condiciones no son compatibles con la forma artesanal en que se realiza la cosecha de concha en el país, ni con las condiciones de las familias que se encargan de realizar su comercialización (Blagoslawski, 2012)

La producción mundial de moluscos bivalvos ha aumentado considerablemente en los últimos cincuenta años, pasando de casi un millón de

toneladas en 1950 a unos 13,6 millones de toneladas en 2005; representando el 10% en cantidad y el 7% en valor del total de la producción pesquera mundial. Siendo China el principal productor seguido de Japón, los EEUU, la República de Corea del Norte, Tailandia, Francia, España, Italia y Chile. En el mismo año la producción acuícola de moluscos bivalvos en América Latina y el Caribe alcanzó aproximadamente 128.500 t lo que representó el 1,0% del total mundial de la producción acuícola (Lovatelli, 2012).

De lo mencionado anteriormente, parte la premisa de considerar que al momento de cultivar bivalvos en áreas costeras, existe una alta probabilidad de exposición de estos organismos a contaminación por aguas residuales, un factor implicado en la transmisión de enfermedades entéricas por su alto contenido de bacterias, parásitos, virus y toxinas con potencial patogénico. Esto podría conllevar a problemas sanitarios, si se toma en cuenta la naturaleza biofiltradora de los moluscos y su capacidad de concentrar microorganismos por un largo periodo de tiempo (Vilariño, 2012). En estas condiciones se crea un mayor riesgo para la salud pública cuando el consumo es en crudo o ligeramente cocidos (Rippey, 2012).

En líneas generales, la depuración es un proceso en el que se trata de reducir la carga bacteriana de los moluscos a un nivel aceptable que no represente un riesgo para la salud pública al ser consumidos crudos o parcialmente cocidos (Blogoslawski, 2012). La purificación controlada de los tejidos de los moluscos con luz ultravioleta (UV), es utilizada extensivamente a nivel mundial y ha sido asociada con la disminución de enfermedades transmitidas por el consumo de moluscos contaminados con bacterias. Al respecto, diversos estudios han demostrado una rápida y eficiente tasa de reducción de las bacterias hasta niveles no detectables dentro de aproximadamente 48 h de depuración con irradiación UV (Doré y Lees, 2012). La desinfección por radiación UV es un procedimiento físico que no altera la composición química, sabor ni olor de los moluscos, constituyendo una alternativa segura y eficaz frente a otros métodos de desinfección, como la cloración y el ozono, que generan subproductos como trihalometanos (THM) y bromato, que son

considerados cancerígenos (Rodríguez *et al.*, 2012). La radiación UV entre 250 – 270 nm constituye la franja del espectro electromagnético considerada germicida y su utilización conlleva a la inactivación del microorganismo (Oguma, 2012).

Para evaluar la calidad sanitaria del molusco depurado es necesario utilizar de manera conjunta indicadores tales como *E. coli* y los estreptococos fecales. En particular, es conveniente utilizar las bacterias fecales para supervisar la respuesta de los bivalvos durante el tratamiento de depuración. Una reducción del promedio de los indicadores bacterianos fecales en los moluscos puede proporcionar una evidencia inequívoca del éxito del tratamiento de depuración (Mesquita *et al.*, 2012). Herrera y Suárez (2012), señalan que *E. coli* y los estreptococos son los indicadores apropiados para determinar la presencia de contaminación de origen fecal, dado que su nicho ecológico habitual es el intestino de los seres humanos y otros animales.

Fujioka. (2012), sostienen que la *E. coli* y estreptococos son frecuentes, y pueden persistir por largos periodos de tiempo en aguas tropicales y subtropicales, pudiendo afectar potencialmente a los moluscos en crecimiento. Cabe destacar que la presencia de estreptococos puede afectar la inocuidad de los bivalvos en cultivo, dado que este indicador puede persistir viable por su capacidad de activar diferentes tipos de estrategias de sobrevivencia, que incluye la adhesión, lo cual posibilita la formación de biopelículas en superficies bióticas y abióticas (Signoretto, 2012). Otro agente microbiano vinculado a enfermedades asociadas al consumo de alimentos es la *Salmonella*, la cual constituye un peligro significativo para la infección de alimentos crudos como es el caso de los moluscos. La detección de este género bacteriano en moluscos bivalvos cultivados ha sido frecuentemente relacionada con su crecimiento en ambientes marinos con influencia de aguas residuales domésticas, industriales o de escorrentías, que acarrea la entrada de bacterias entéricas que representan una fuente de contaminación potencial en los hábitats costeros (Venkateswaran, 2012).

1.5. Bacterias Marinas

Las bacterias desarrollan funciones biológicas importantes en el ambiente marino y son especialmente importantes en la zona anaeróbica de los sedimentos. Algunas de estas funciones bacterianas en los océanos es la conversión y translocación de los minerales (ciclos elementales, mineralización), producción y descomposición de la materia orgánica (cadenas tróficas) y alteración de las propiedades físicas de las comunidades marinas (pH, nivel de oxígeno) (Dawes, 2010).

Las bacterias viven en todos los tipos de ambiente marino, como son el agua del mar abierto (bacterias planctónicas o bacterioplancton; autótrofas y heterótrofas), el piso del fondo marino (epibacterias, heterótrofas), la zona nerítica y estuarios. El mayor número de bacterias se encuentran en las aguas subtropicales a tropicales sobre las regiones costeras donde los nutrientes y materia orgánica existen en abundancia (Rheinheimer; 2010).

Se ha revisado la incógnita de sí las bacterias marinas existen realmente y se han establecido una serie de criterios para tal efecto. Estos criterios se han adoptado para dividir a las formas marinas nativas, las bacterias autóctonas y las bacterias terrestres que son transitorias en el medio marino (Zobell, 2010; Brown, 2010).

1.6. Los coliformes como organismos indicadores de contaminación.

En Panamá al igual que en muchos países, las mediciones de la calidad sanitaria incluyen el análisis de bacterias coliformes. A este grupo de bacterias se les considera como "organismos indicadores", ya que comprueban la presencia de material fecal animal o humano.

Los coliformes se relacionan con las vías intestinales y en consecuencia, su presencia indica que el agua ha recibido contaminación de origen intestinal. Generalmente, las bacterias coliformes pertenecen al grupo de bacterias entéricas, a la familia *Enterobacteriaceas*, que están definidas en la bacteriología del agua como toda bacteria aeróbica y anaerobios facultativos, Gram negativa, no

formadoras de esporas, en forma de bastón y que fermentan la lactosa con la formación de gas a 35 °C en 48 h (Madigan, 2010).

En el caso de los coliformes totales, aunque estos normalmente se usan como un criterio de la presencia de material fecal en las aguas, lo cierto es que son parte de la microflora de la vegetación y no necesariamente, indican la presencia de patógenos (Toranzos, 2010; Eaton *et al.*, 2010). Los coliformes fecales (ahora denominados: coliformes termotolerantes), es un grupo más realista como indicador de contaminación fecal y a diferencia de los coliformes totales, fermentan la lactosa con producción de gas y ácido a 44.5 ± 0.2 °C (Toranzos y McFeters, 2010).

1.7. Microorganismos Patógenos (*Salmonella spp.*)

Causa la fiebre tifoidea y la fiebre paratifoidea, contamina los moluscos a través de las heces humanas, incluidas las aguas residuales fecales, cuando en una población local hay personas que excretan bacterias, bien en casos clínicos o de forma como portadores. Las otras especies que causan gastroenteritis están asociadas tanto a heces humanas como animales. Las infecciones por *Salmonella spp.*, que están relacionadas con los moluscos, suponían un problema significativo en Europa y en América del Norte, pero ahora son menos frecuentes, debido en parte a las mejoras generales en la sanidad pública, que han logrado reducir la incidencia de la fiebre tifoidea y paratifoidea en la comunidad, así como el riesgo de las bacterias causantes que contaminan a los moluscos a través de las aguas residuales fecales (Rippey, 2010).

1.7.1. *Vibrio spp.*

Estos microorganismos se caracterizan por ser bacilos curvos Gram negativos, la mayor parte son móviles con 1 a 3 flagelos polares. Son aerobios o anaerobios facultativos.

Son patógenos y existe cierto número de especies del género *Vibrio* que provocan enfermedades relacionadas con el consumo de moluscos. Las dos más importantes en términos de número de infecciones o mortalidad son *Vibrio*

parahaemolyticus y *Vibrio vulnificus*. La mayoría de estos vibrios se encuentran de forma natural en medios costeros y estuarios, y no están asociados a contaminaciones fecales. A diferencia de los *Vibrio cholerae* que provocan el cólera epidémico, están normalmente relacionados con contaminaciones fecales humanas aunque algunas cepas de estos tipos y de los que causan gastroenteritis no colérica, pueden ocurrir de forma natural en el medio marino (Lee y Younger, 2010).

1.7.2. *E. coli*

Es una bacteria que se encuentra normalmente en el tracto gastrointestinal de los seres humanos y animales de sangre caliente. Debido a su elevada presencia en el tracto gastrointestinal y en las heces, la *E. coli* se utiliza como el indicador principal de contaminación fecal en la evaluación de la inocuidad de los alimentos y el agua. La mayoría de las *E. coli* son organismos comensales inofensivos cuando se encuentran en su hábitat intestinal natural. Diferentes cepas de *E. coli* son patógenos gastrointestinales graves para los seres humanos y algunas también, son patógenos para animales jóvenes destinados a la producción de alimentos. Las *E. coli* patógenas se distinguen de otras *E. coli* por su capacidad de provocar enfermedades mediante mecanismos genéticamente controlados, como la producción de toxinas, la adhesión e invasión de células huésped, la interferencia con el metabolismo celular y la destrucción de tejidos. La *E. coli* tiene la capacidad de intercambiar material genético por medio de elementos genéticos móviles, tales como plásmidos, transposones, integrones y bacteriófagos, como respuesta de adaptación a entornos nuevos y adversos. Se cree que estos elementos genéticos contribuyen a la aparición de agentes patógenos con mayor virulencia, supervivencia ambiental y persistencia en los sistemas alimentarios (Brandl, 2010).

1.8. Otras bacterias (*Pseudomonas* sp.)

El género *Pseudomonas* se compone de bacilos rectos Gram negativos que miden entre 0.5-10 μm de largo por 1.5-4.0 μm de ancho y tienen flagelo polar, único o múltiple. La mayoría de las especies de *Pseudomonas* tienen requerimientos nutricionales muy sencillos y se desarrollan adecuadamente a valores de pH y a

temperaturas entre los límites de las mesófilas (25-40°C) (Mcjunki 2006; Brock, 2010)

Son aerobios, no fermentativos que se encuentran en los suelos, aguas y en ocasiones en peces en descomposición. En su hábitat natural, estos microorganismos ampliamente distribuidos desempeñan un papel importante en la descomposición de materia orgánica. Diversas especies son importantes patógenos vegetales, mientras que otras pueden infectar animales y en peces, se consideran patógenos secundarios ya que actúan como oportunistas (McLeod 2010; Brock, 2010)

1.8.1. *Staphylococcus sp.*

Los estafilococos son cocos Gram positivos que se observan en forma de racimos. Son organismos anaerobios facultativos, capaces de desarrollarse bien en condiciones de alta presión osmótica. La temperatura óptima de crecimiento es de 37°C. Son parásitos frecuentes del hombre y animales, y en ocasiones originan infecciones serias (Tortola, 2012).

1.9. Zona de producción y captura de concha negra

La zona de producción de El Espavé, se encuentra ubicada en la parte occidental de la provincia de Panamá Oeste, en la cordillera central, en la vertiente del Pacífico, a unos 65 km de la ciudad de Panamá. 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 (Cuadro 1) (Berdiales, 2009).

1.10. Clasificación de las zonas de producción

El programa de Sanidad de Moluscos Bivalvos (PSMB) clasifica las áreas de producción de moluscos bivalvos en áreas aprobadas o condicionalmente aprobadas (Área tipo A) cuyos media geométrica aceptada para Coliformes totales es de ≤ 70 a 230 y coliformes fecales \leq de 14 a 43; áreas restringidas o

condicionalmente restringidas (Área tipo B) Coliformes totales \leq de 700 a 2300, con la condición de depurar o reinstalar la zona de producción en un sitio autorizado y las áreas prohibidas (Área tipo C) sin estudios sanitarios o incumplimiento de las zonas autorizadas, bajo los estándares de la Food and Drug Administration (FDA) y la Unión Europea (UE), reglamentos basados en la cantidad de coliformes totales y coliformes fecales encontrados en las muestras de agua (Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, 2003; FAO, 2010; Programa Moluscos Bivalvos, 2006). Los parámetros establecidos por las mencionadas organizaciones son acatadas y puestas en práctica por instituciones sanitarias pesqueras como el ITP/SANIPES e IMARPE (Procedimiento: Control oficial de zonas y áreas de producción clasificadas de moluscos bivalvos. ITP, 2012. FIGURA 24).

De acuerdo con los estándares internacionales y de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2005), el nivel permisible de enterococos (bacterias resistentes a la salinidad marina) es de 500 UFC/100 (mL) de agua.

1.11. Criterios microbiológicos del molusco de las zonas de producción (músculo y líquido intervalvar).

A: \leq 230 UFC de *E. coli*/100 g de carne y líquido inter-valvar, no se realiza tratamiento.

B: Los moluscos bivalvos vivos de estas zonas no deben superar los límites de una prueba de cinco tubos, tres diluciones, número más probable (NMP) de 4600 UFC de *E. coli*/100 g de carne y líquido inter-valvar en más del 10% de las muestras (Depuración, reinstalación en una zona de clase A o cocinado según un método autorizado).

C: Los moluscos bivalvos vivos de estas zonas no deben superar los límites de una prueba de cinco tubos, tres diluciones, NMP de 46.000 UFC de *E. coli*/100 g de carne y líquido intravalvar (Reinstalación durante un periodo largo o cocinado según un método autorizado) (Anón, 2010).

Prohibida >46.000 UFC de *E. coli*/100g de carne y líquido intervalvar (No se permite la recolección)

CAPÍTULO II: METODOLOGÍA

2. METODOLOGÍA

El sistema de depuración consistía en una canasta de cultivo de moluscos (canasta ostrícola), la cual se colocará dentro de tinas de depuración, con un flujo continuo de agua de mar tratada y desinfectada (Anon, 2010)

El proceso de depuración se llevó a cabo en base a 4 tratamientos (12, 24, 36 y 48 h), cada uno por triplicado, los resultados obtenidos se interpretaron en función del tiempo en que demoró el proceso de depuración de los organismos y de la determinación de los microorganismos (coliformes, patógenos y recuento de bacterias). En cada una de las tinas de depuración, se tomaron ejemplares (aproximadamente 50) para llevar la cantidad de muestra (150 g de tejido y líquido intervalvar) para cada uno de los análisis microbiológicos. Las muestras fueron transportadas en envases individuales, etiquetados y en cadena de frío al laboratorio para su inmediato procesamiento (Anon, 2010)

Se realizaron recuentos de bacterias mesófilas por dilución seriada, determinación y aislamiento de *Vibrio spp* y *Salmonella spp*, por método de medios selectivos e identificación con el Kit Api 20E (Bioemereux, Francia), para *Enterobacteriaceae* y otras bacterias Gram negativas.

Se realizó la evaluación de la calidad química y microbiológica del agua utilizada antes y después del proceso de depuración (4 tratamientos) y se realizará un monitoreo de las condiciones fisicoquímicas del sistema.

2.1. Determinación de Coliformes totales y *E. coli* por el método de tecnología de sustrato definido (muestras de agua).

Una vez llegaron las muestras al laboratorio son sacadas de las neveras y llevadas al laboratorio de microbiología.

Para el procesamiento de la muestra, la Cámara de Flujo laminar fue encendida y limpiada con Alcohol al 70%, una vez limpia la cámara, se encendió la luz UV por lo menos 15 min y luego, se procedió a colocar dentro de la misma los Erlenmeyer estériles que son utilizados para las diluciones de la muestra (SEIMC,2006).

Los Erlenmeyer fueron rotulados con el nombre o código de la muestra y el número de dilución 10^{-1} , 10^{-2} ó 10^{-3} (y si el punto de muestreo lo requiere). Los matraces de 10^{-1} deben ser llenados con 100 mL de muestra, los Erlenmeyer de 10^{-2} deben ser llenados con 10 mL del elermeyer de 10^{-1} y diluidos con 90 mL buffer fosfato, y los matraces de 10^{-3} deben ser llenados con 1 mL del elermeyer de 10^{-2} y diluidos en 99 mL de buffer fosfato.

Las bandejas de 97 pozos fueron rotuladas con el nombre y código de la muestra y el número de dilución. Se encenderá el sellador Quanti-Tray por lo menos 15 min antes de utilizarse.

La botella con muestra ser rociaron por fuera con Alcohol al 70%, para eliminar microorganismos externos. Una vez que se diluyó la muestra, se procedió a agregar el reactivo Colillert para la detección de *Coliformes* totales y *E. coli* a cada matraz con que posea muestra diluida, se agitaron suavemente el mismo hasta disolver el producto. Luego, se vació la mezcla en una Bandeja de 97 pozos y se insertó en el sellador Quanti-Tray, y se incubaron la misma a 35°C por 24 ± 2 h.

Los resultados, pasadas las 24 ± 2 h de incubación se realizaron las lecturas de los coliformes totales (por cambio de incoloro a amarillo) y de *E. coli* y *enterococos* por fluorescencia en presencia de UV, utilizando una lámpara de UV. Por último, se cuantificaron estos microorganismos utilizando *MPN Generator V3.1 program* 09-63588-02 o la tabla de números más probable (NMP) para 97 pozos.

2.2. *Salmonella* spp (Preenriquecimiento).

En un plato Petri estéril y en un área aséptica, se pesaron 25 g del tejido de cada muestra incluyendo el líquido inter-valvar, y luego, el contenido de la muestra se agregó en una bolsa stomacher estéril con 225 mL de caldo lactosado, se procedió a macerar y homogenizar con el diluyente durante 30 s y posteriormente, se incubó la muestra homogénea a 35°C durante 24 h (Marshall, 1992)

2.2.1. Enriquecimiento selectivo.

Se procedió a homogenizar el caldo lactosado después de la incubación. Luego, se tomó 1 mL del cultivo anterior con una pipeta de vidrio de 1 mL estéril y se transfirió a un tubo que contenía 9 mL de caldo selenito cistina y otro mL se transfirió a un tubo que contenía 9 mL de caldo tetrionato y se procedieron a incubar ambos inóculos a 43°C por 24 h (Marshall, 1992)

2.2.2. Aislamiento diferencial

En este proceso se homogenizó el tubo de caldo selenito-cistina y tetrionato, posteriormente se tomó una muestra del cultivo con un asa microbiológica estéril y se estrió por agotamiento en agar XLD (xilosa, lisina, desoxicolato), Bismuto sulfito, Salmonella-Shigella y Hepktoen, y se incubó a 35°C durante 40 h (Marshall, 1992)

Posteriormente, se seleccionaron colonias positivas de cada agar, en donde las colonias rosas cremosas dieron como positivas en XLD (xilosa, lisina, desoxicolato agar), las colonias café o grises con tonos metálicos como positivas en bismuto sulfito, para Salmonella-Shigella las colonias rosas opacas o translucidas y para hepkoen las colonias café con tonos metálicos. Luego de obtener esos resultados, se transfirieron con una asada a tubos con medio agar triple azúcar (TSI) y lisina hierro agar (LIA), y se incubaron a 35°C por 24 h. Después, se le realizaron pruebas bioquímicas para determinar género y especie con la técnica de API20E (Bioemereux, Francia), a cada una de las resultaron positivas. En este caso, los tubos de lisina hierro agar (LIA) dieron positivos ya que los tubos permanecieron de color lila y en agar triple azúcar (TSI) dieron positivos porque el fondo era amarillo y la pendiente roja (D'Aoust, Maurer y Baile, 2001)

2.3. *Vibrio cholerae* (Enriquecimiento).

Se pesó 25 g de la muestra del molusco, incluyendo el líquido inter-valvar y se depositó en una bolsa stomacher estéril, a la cual se le añadió 225 mL de agua peptonada alcalina, homogenizamos durante 2 min, esta resulto como la dilución 1:10. Luego, se tomó 1 mL del homogeneizado y se prepararon dos series de diluciones 1:100 y 1:1000 en 9 mL de agua peptonada alcalina, de la cual se

obtuvieron dos series de diluciones y posteriormente, se incubó una serie a 35-37°C y la otra a 42°C durante 24 h (García, Vargas y Guzmán, 2018)

2.3.1. Aislamiento selectivo

Después de la incubación y sin agitar los tubos, se transfirió una asada del crecimiento superficial de cada dilución a una caja que contenía agar TCBS, se inoculó el agar estriando por agotamiento y luego, se incubaron los platos de agar TCBS a 35°C durante 18-24 h. Se examinaron los platos para determinar la presencia de las UFC positivas que son amarillas cremosas o verdes translúcidas. Posteriormente, se seleccionaron estas UFC y se inocularon en agar TSA, y se incubaron a 35°C por 24 h, determinando colonias cremas y redondas como positivas. Luego, se transfirió una asada a tubos con medio agar triple azúcar hierro (TSI) y agar lisina hierro (LIA), y se incubaron a 35°C por 24 h, para luego, realizarle la prueba bioquímica para identificar género y especies (API20E Bioemereux, Francia), a las UFC que resultaron positivas, las cuales para agar triple azúcar hierro (TSI), los tubos positivos cambian el medio a una coloración amarilla y para el agar hierro lisina (LIA), los tubos que presentan fondo amarillo y pendiente lila son positivos (García, Vargas y Guzmán, 2018)

2.4. *Staphylococcus aureus* (Aislamiento y enriquecimiento)

En este proceso, se pesó 10 g de muestra de bivalvo incluyendo líquido inter-valvar en un plato Petri estéril y luego, se transfirió la muestra pesada a una bolsa stomacher estéril, a la cual se le añadió 90 mL de caldo lactosado y se homogenizó por 30 s. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas de base 10 hasta 10^{-5} , en tubos conteniendo 9 mL del mismo diluyente y se transferieron 1 mL de de cada diluciones hasta 10^{-5} a platos Petri y luego, se le añadió el agar, que en este caso era agar Baird Parker para *staphylococcus*, se homogenizó con movimientos suaves para distribuir bien la muestra. Seguido de enfriadas, se incubaron los platos Petri en forma invertida por 24-48 h a 37°C. Por último, se seleccionaron los platos que contenían entre 25-250 UFC y que presentaban características cremas y opacas, las cuales se reportaron como mesófilos aéreos por unidad de marisco o g de la muestra (Lancette y Bennett, 2001)

2.5. Mesófilos aerobios

Se pesaron 10 g de la muestra de molusco incluyendo el líquido inter-valvar, en un plato Petri estéril y luego, se depositó en una bolsa stomacher estéril, y se le añadió 90 mL de caldo lactosado, y se procedió a homogenizar. Se realizaron diluciones seriadas de base 10 hasta 10^{-5} . Luego, se preparó 100 mL de agar nutritivo, a la cual se le añadió 1 mL de cada dilución a los platos Petri y

posteriormente, se le añadió el agar de Recuento, se homogenizó con movimientos suaves para distribuir bien la muestra. Luego de enfriadas, se procedieron a incubar los platos Petri en forma invertida por 24-48 h a 37°C. Se seleccionaron los platos que contenían entre 25-250 colonias y se reportaron como mesófilos aéreos por unidad de marisco o g de la muestra (Camacho, 2009)

2.6. Bacterias coliformes y *E. coli* (en bivalvos, prueba presuntiva)

Se pesará 10 g de muestra y se le añadió 90 mL de caldo lactosado, y se maceró hasta homogenizar en una bolsa Stomacher estéril. Del paso anterior, se transfirió 1 mL a tubos con caldo lactosado que contenían 9 mL del mismo diluyente y se realizan diluciones seriadas de base 10 hasta 10^{-5} . Se preparó 100 mL de agar bilis violeta-rojo (VRBA), y se le adiciono 1 mL de cada dilución a los platos Petri y posteriormente, se le añadió el agar, y se homogenizaron con movimientos suaves para distribuir bien la muestra. Después de enfriadas los platos Petri, se incubaron en forma invertida por 24-48 h a 37°C. Se seleccionaron los platos que contenían entre 25-250 UFC y se reportaron como mesófilos aéreos por unidad de marisco o g de la muestra (Kornacki y Johnson, 2001)

CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS

1. Distribución de UFC entre las categorías de mes

La distribución de la mediana son parecidas entre los meses de estudios, en este caso enero, febrero y noviembre, pese a observarse un mayor recuento en el mes de noviembre como el punto máximo, aun así no existe una diferencia significativa entre los recuentos durante los meses de estudio (Gráfico. 1).

Se aplicó la prueba de Kruskal Wallis para la comparación de muestras independientes, en este caso para comparar los *coliformes* totales, *E. coli* y *Enterococos* entre los tres meses (noviembre, enero y febrero). De acuerdo al contraste podemos indicar que no se puede rechazar la hipótesis nula, ya que la distribución de las UFC/100 mL de *Coliformes* totales, *E. coli* y *Enterococos* entre los meses analizados es la misma. Por tanto, no hay diferencias significativas entre los meses ($p = 0,075 > 0,05$).

En el diagrama de caja se presenta en el eje de las abscisas los meses analizados, enero, febrero y noviembre. En las ordenadas se encuentra la concentración de *Coliformes* totales, *E. coli* y *Enterococos* en UFC/100 mL. La mediana es parecida en los tres meses, sin embargo, a pesar que en noviembre los recuentos son más altos, estos no son significativos comparados a los de los meses de enero y febrero (Gráfico 1).

2. Distribución de UFC entre las categorías de sitio

Los datos indican que en los diferentes sitios de extracción de concha negra la distribución de las UFC se manifiesta de la misma forma sin diferencias significativas entre los diversos puntos de extracción, es decir los recuentos encontrados entre los diversos sitios son parecidos (Gráfico. 2).

Para el análisis de UFC entre las categorías de los sitios se aplicó la prueba de Kruskal Wallis para la comparación de muestras independientes, en este caso para comparar los sitios (manglares de coto), donde se realizaron los muestreos de agua y captura de moluscos para los análisis microbiológicos. De acuerdo al contraste podemos indicar que no se puede rechazar la hipótesis nula en la cual la distribución de los UFC/100 mL entre los sitios, es la misma. Por lo tanto, no hay diferencias significativas entre los sitios de muestreo ($p = 0,518 > 0,05$).

En el diagrama de caja se presenta en el eje de las abscisas los sitios analizados, que comprenden desde coto 1 hasta coto 5 y en las ordenadas se encuentra la concentración de coliformes totales, *E. coli* y enterococos en UFC/100 mL. La mediana es parecida en los 5 puntos, sin embargo, no existe diferencia significativa entre los sitios (Gráfico 2).

3. Distribución de UFC entre las categorías de indicador

Los indicadores como *Coliformes* totales, *E. coli* y *Enterococos* presentan una distribución de UFC parecida, en donde *Coliformes* totales y *E. coli* se encuentran más ajustados hacia la media, sin embargo *Enterococos* presenta una distribución por debajo de la media por lo tanto, si existe una diferencia (Gráfico. 3).

Se aplicó la prueba de Kruskal Wallis para la comparación de muestras independientes, en este caso para comparar los indicadores de contaminación (*Coliformes* totales, *E. coli* y *Enterococos*). De acuerdo al contraste podemos indicar que se puede rechazar la hipótesis nula en la cual la distribución de los UFC/100 mL entre las categorías de indicador no es la misma. Por lo tanto, si hay diferencias significativas entre las categorías de indicador ($p = 0,000 > 0,05$).

En el diagrama de caja se presenta en el eje de las abscisas los indicadores, *Coliformes* totales, *E. coli* y *Enterococos*. En las ordenadas se encuentra la concentración de *Coliformes* totales, *E. coli* y *Enterococos* en UFC/100 mL. La mediana no es parecida en los tres indicadores, lo que indica que la distribución de los tres indicadores en aguas marinas y costeras no son las mismas (Gráfico 3).

4. Distribución de UFC entre las categorías de indicador y las horas del tratamiento.

La distribución de UFC en cada uno de los indicadores y en los distintos tiempos de depuración varía uno del otro, lo que indica que existe una diferencia significativa entre sí, lo cual es evidente si observamos el ajuste de UFC en cada media por tiempo y organismo indicador (Gráfico. 4).

Se aplicó la prueba de Kruskal Wallis para la comparación de muestras independientes, en este caso para comparar los indicadores de contaminación (*Coliformes* totales, *E. coli* y *Enterococos*), durante los tiempos de depuración (12, 24 y 36 h). De acuerdo al contraste podemos indicar que se puede rechazar la hipótesis nula en la cual la distribución de los UFC/100 mL entre las categorías de indicador y las horas de depuración no es la misma. Por lo tanto, si hay diferencias significativas entre las categorías de indicador y las horas de depuración ($p = 0,019 > 0,05$).

En el diagrama de caja se presenta en el eje de las abscisas los indicadores, *Coliformes* totales, *E. coli* y *Enterococos*. En las ordenadas se encuentra la concentración de *Coliformes* totales, *E. coli* y *Enterococos* en UFC/100 mL. La mediana no es parecida en los tres indicadores durante las horas de depuración, en el caso de *E. coli* 12 h con los demás tiempos de depuración la diferencia es más notable y en la caso de *Enterococos* los valores fluctúan con niveles altos y bajos durante los distintos tiempos de depuración por lo tanto, la distribución de los tres indicadores durante los tiempos de depuración no son las mismas (Gráfico 4).

5. Distribución de UFC entre las categorías de tratamiento.

Entre los diferentes tratamientos contrastados con el tratamiento del sistema de depuración las diferencias no son percibidas, debido al comportamiento en la distribución de los recuentos encontrados en los diferentes tratamientos, la ligera tendencia de percibir las UFC por debajo de la media entre tratamiento del sistema de depuración en comparación a los demás, no marca una diferencia significativa con respecto a las otras categorías de tratamiento (Gráfico. 5).

Se aplicó la prueba de Kruskal Wallis para la comparación de muestras independientes, en este caso para comparar las categorías del tratamiento (T1, T2, T3 y Tsist). De acuerdo al contraste podemos indicar que se conserva la hipótesis nula en la cual la distribución de los UFC/100 mL entre las categorías de los tratamientos es la misma. Por lo tanto, no hay diferencias significativas entre las categorías de indicador y las horas de depuración ($p = 0,073 > 0,05$).

En el diagrama de caja se presenta en el eje de las abscisas los tratamientos T1, T2, T3 y Tsist. En las ordenadas se encuentra la concentración de UFC/100 mL en los diferentes tratamientos. La mediana es parecida en los tres tratamientos durante la depuración, en el caso de Tsist, en comparación con los demás tratamientos de depuración la diferencia es más notable, esto debido a la baja cantidad microbiana encontrada, sin embargo, esto no influye directamente sobre los demás tratamientos, por lo tanto, no tiene una diferencia significativa entre sí (Gráfico 5).

6. Comparación de los indicadores coliformes totales, *E. coli* y enterococos entre los tratamientos cada 12 horas.

La distribución de las UFC por indicador durante los tiempos de depuración son los mismos, es decir en los tiempos de depuración de 12 y 24 h existe una clara similitud de distribución cerca de la media en los *Coliformes* totales, *E. coli* y *Enterococos*, en los tiempos de depuración de 36 y 48 h parecen diferir de los demás pero la distribución de las UFC no reflejan una diferencia significativa en relación a los demás tiempos de depuración (Gráfico. 6).

Se aplicó la prueba de Kruskal Wallis para la comparación de muestras independientes, en este caso para comparar las categorías de los indicadores cada 12 h durante la depuración. De acuerdo al contraste podemos indicar que se conserva la hipótesis nula, en la cual la distribución de los UFC/100 mL entre las categorías de los indicadores cada 12 h es la misma. Por lo tanto, no hay diferencias significativas entre las categorías de indicador durante las horas de depuración ($p = 0,672 > 0,05$).

En el diagrama de caja se presenta en el eje de las abscisas las horas de depuración. En las ordenadas se encuentra la concentración de UFC/100 mL

durante las diferentes horas de depuración. La distribución de las UFC por indicador durante los tiempos de depuración son los mismos, es decir en los tiempos de depuración de 12 y 24 h existe una clara similitud de distribución cerca de la media en los *Coliformes* totales, *E. coli* y *Enterococos*, en los tiempos de depuración de 36 y 48 h parecen diferir de los demás pero la distribución de las UFC no reflejan una diferencia significativa en relación a los demás tiempos de depuración (Gráfico 6).

7. Distribución de las UFC entre las categorías de tratamiento.

En 12 y 24 h no se evidencian las diferencias en las distribuciones de las UFC de los tres tratamientos, en los demás tratamientos la distribución de las UFC son similares, por lo tanto, existe diferencias significativas, en el caso del tratamiento del sistema solo existe evidencia en reportes de UFC a las 12 h (Gráfico. 7).

Se aplicó la prueba de Kruskal Wallis para la comparación de muestras independientes, en este caso para comparar las categorías de los tratamientos durante las horas de depuración. De acuerdo al contraste podemos indicar que se rechaza la hipótesis nula, en la cual la distribución de los UFC/100 mL entre las categorías de los indicadores por tratamiento durante la depuración, no es la misma. Por lo tanto, existen diferencias significativas entre las categorías de tratamiento durante las horas de depuración ($p = 0,000 > 0,05$).

En el diagrama de caja se presenta en el eje de las abscisas las horas de depuración. En las ordenadas se encuentra la concentración de UFC/100 mL durante las diferentes horas de depuración. La distribución de las UFC por tratamiento durante los tiempos de depuración no son los mismos, puesto que en 12 y 24 h no se evidencian las distribuciones de las UFC de cada tratamiento, en los demás tratamientos de 36 y 48 h la distribución de las UFC presentan diferencias entre sí, por lo tanto, existe diferencias significativas, y en el caso del tratamiento del sistema solo existe evidencia en reportes de UFC a las 12 h. (Gráfico 7).

/DISCUSIÓN

Distribución de UFC entre las categorías de mes.

La prueba de Kruskal Wallis demostró que no existe una diferencia significativa entre los meses de estudios pese a existir una ligera mayor abundancia de los coliformes termotolerantes y otros patógenos en el agua marino-costera, lo cual se observó durante esta estación (lluviosa), sin embargo autores como González (2003), señalan que durante esta temporada las aguas costeras reciben un mayor volumen de aguas de escorrentía, la intensidad de las lluvias hacen que fluyan los microorganismos y los nutrientes del suelo lo cual provoca un incremento en las densidades de bacterias indicadoras de contaminación fecal y microorganismos patógenos.

Siendo esta una zona rural de la República de Panamá, con presencia de actividades domésticas, agrícolas e industriales y un mal manejo e inadecuado control de los desechos sólidos y líquidos que se dan en la zona, podrían ser estos los responsables de los niveles de *Coliformes* termotolerantes y *E. coli* observados (Marín, 2004; Ramos, 2008).

Distribución de los UFC entre los sitios de muestreo.

Los valores de NMP supera las 2300 UFC para coliformes totales y 260 UFC para coliformes termotolerantes, se puede decir que de acuerdo a la FAO (2010) y al Programa de Sanidad de Moluscos Bivalvos (PSMB) (2006), quienes clasifican las áreas de producción de moluscos bivalvos en áreas restringidas o condicionalmente restringidas (Área tipo B), bajo los estándares de la FDA y la Unión Europea (UE), reglamentos basados en la cantidad de coliformes totales y coliformes termotolerantes encontrados en las muestras de agua (Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, 2003; FAO, 2010; Programa de Sanidad de Moluscos Bivalvos, 2006). Por lo tanto, 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 (FAO, 2010).

Distribución de UFC entre los indicadores.

Según Cabelli (2005), los enterococos son superiores como organismos indicadores en lugar de *Coliformes* totales o termotolerantes o *E. coli*, debido a que los *Enterococos* simulan mejor las características de supervivencia del agente etimológico. Es importante destacar que la mayoría de los sitios que registran una concentración notable de estos microorganismos, por lo general se localizan en las lagunas encerradas o bahías costeras, accidentes geográficos que evitan una buena circulación de las corrientes marinas, favoreciendo así, la estadía o presencia de estas bacterias en las aguas interiores (Escobar, 1983).

Estadísticamente, la prueba de Kruskal Wallis no mostró diferencias significativas en la disminución o eliminación de organismos indicadores durante los distintos tiempos de depuración (Gráfico 4-7), caso contrario a lo que señalan ciertos autores por ejemplo, Jay (2012), quien señala que mediante la depuración de los moluscos con luz ultravioleta se logró en cortos periodos de tiempo la eliminación de las bacterias coliformes, especialmente las de naturaleza fecal como *E. coli*. De hecho, Jones. (2012), concuerda diciendo que la aplicación de un sistema de depuración para bivalvos con flujo continuo de agua irradiada con luz ultravioleta, demostró ser eficaz en la purificación de los bivalvos. Su principal ventaja es que se realiza bajo condiciones controladas, es decir, los animales no están expuestos a los cambios bruscos que pueden producirse en el medio marino (mareas, actividades antropogénicas, etc) y que la remoción bacteriana se da en un corto periodo de tiempo.

Dado el caso que el sistema de depuración no funcione de forma adecuada, autores como Lee. (2012), Señalan la importancia de que el método de aireación aplicado para procurar una buena concentración de oxígeno en el agua, no comprometa otros aspectos del proceso, por ejemplo, que no provoque la resuspensión o la correcta eliminación de las heces y pseudoheces expulsadas por los bivalvos, siendo esta la posible causa de los resultados obtenidos durante los procesos de depuración.

Muestras de carne durante el proceso de depuración (músculo y líquido intervalvar).

Para la verificación de la eficiencia del proceso de depuración bacteriana en los bivalvos, se consideraron los niveles máximos permitidos para el consumo de moluscos y los resultados de NMP obtenidos en las muestras de carne, sobrepasan los límites permitidos ya que de acuerdo al Programa de Sanidad de Moluscos Bivalvos (PSMB) (2006) y bajo los estándares de la FDA, establecen que 300 UFC de coliformes termotolerantes, 230 UFC de *E. coli*, mesofilo aerobios 5×10^5 , staphylococcus y pseudomonas <230 UFC por 100 g de carne.

No se observó la eficacia en el proceso de depuración, por lo tanto se coteja con lo señalado por Li. (2010), la evidencia disponible apoya la hipótesis de que la persistencia de bacterias en el tejido de bivalvos depende en gran parte su sensibilidad a la actividad bactericida, las propiedades de la superficie celular de las bacterias y las condiciones ambientales.

CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

1. Los sitios de extracción en la zona de producción del Espavé de Chame, Provincia de Panamá Oeste, presentaron un alto N° de UFC tanto para *Coliformes* totales, *Coliformes* termotolerantes, *E. coli* y *Enterococos*.
2. Los niveles de UFC/g registrados en músculo y líquido inter-valvar, se elevaron durante las horas de depuración debido a una recontaminación de los organismos.
3. La zona de producción del Espavé de Chame, Provincia de Panamá Oeste, de acuerdo a la UE y a la FDA, se ubica en (Área tipo B) o sea área restringidas o condicionalmente restringidas (2016).
4. No se encontraron reportes para *Vibrio cholerae* y *Salmonella spp.*
5. Se encontró la presencia de un reporte de *E. coli* 1 y en general de *Raoultella planticola*.
6. No se pudo evidenciar la eficacia del método de depuración para la concha negra debido a las condiciones ambientales controladas en laboratorio y el fallo en el sistema de depuración.

Recomendaciones

1. Monitorear los parámetros fisicoquímicos y determinar el comportamiento de la *Anadara spp.* en la zona de producción del Espavé de Chame, Provincia de Panamá Oeste, durante los meses de estación seca y lluviosa.
2. Determinar la calidad microbiológica de las aguas de los sitios de extracción y de los organismos en este caso la *Anadara spp.* en la zona de producción del Espavé de Chame, Provincia de Panamá Oeste, durante los meses de estación seca y lluviosa.
3. Mejorar cada una de las condiciones controladas de laboratorio y del sistema, para obtener mayor eficacia en el proceso de depuración.
4. Recomendar a las autoridades competentes sobre la información que puedan proveer a los habitantes de esta zona de producción de los sitios de extracción, que conozcan la calidad del producto y los requisitos de inocuidad para que eviten un mayor riesgo de afecciones por el consumo de este producto pesquero.
5. Realizar estudios en esta zona de producción para evaluar otros contaminantes como otros patógenos, metales pesados, plaguicidas y otros tóxicos que puedan afectar directamente a este producto.

CAPÍTULO V: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS Y ANEXOS

- Anón. 2010. Reglamento (CE) no 2073/2010 de la Comisión de 15 de noviembre de 2010 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios.
- Anón. 2010. Reglamento (CE) no 854/2010 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2010, por el que se establecen normas específicas para la organización de controles oficiales de los productos de origen animal destinados al consumo humano.
- Arizpe, Covarrubias, Oscar (2010). Estudio de la producción secundaria de callo hacha (pinna rugosa) y ostión japonés (*Crassostrea gigas*) en Bahía de La Paz.
- Berdiales, J. 2009. Informe del componente de manglar región de panamá oeste. Ministerio de ambiente. pp 2-9.
- Blagoslawski, W., & Stewart, M. 2012. Depuration and public health. Journal of the World Mariculture Society. 41:535-545.
- Blagoslaowski, W. 1991. Enhancing shellfish depuration. MolluscanShellfish Depuration. pp 145-148.
- Blogoslawski, W., Pérez, C. y Hitchens, P. 2012. Ozone treatment of seawater to control vibriosis in mariculture of penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. International Ozone Association, Pan American Committee, Connecticut.
- Brandl, M.T. 2010. Fitness of human enteric pathogens on plants and implications for food safety. Annual Review of Phytopathology. 44:367–392.
- Brock T.D. Madigan M.T. Martenko J.J. y Parker J. (Eds) (2010). Biología de los microorganismos. 8ª Edición. Prentice Hall International.
- Brown, L. D y C.R Dorn, 2010. Fish shellfish and human health. Journal of Food protection 40: 712-717. Carney, J. F., C. E. Carty y R.R. Colwell. 1975. Seasonal occurrence and distribution of microbial indicators and pathogens in the Rhode River of Chesapeake Bay. Applied Environmental Microbiology. 30 (5):771-780.

- Camacho, A., Giles, M., Ortegón, A., Palao, M., Serran, B., & Velázquez, O. (2009). Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos (2 Ed.). México D.F.: Comité editorial de la Facultad de Química, UNAM-UAM.
- Cantelmo, F & Carter, T. 2010. A physiological indicator of hard clam commercial depuration. MTS Journal. 23:9-13.
- Canter, L. 2012. Manual de evaluación de impacto ambiental. 2th Edición McGraw-Hill/Interamericana. España, Madrid.
- Carpenter, P. L. 2012. Microbiología. Ed Interamericana. México. pp. 518. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo. 2016. Manual de buenas prácticas de Producción Acuícola de Moluscos Bivalvos para la inocuidad alimentaria. Mazatlán: Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo. pp 83.
- Christophersen, C., O. Crescente, J. Frisvad, L. Gram, J. Nielsen, P. Nielsen & L. Rahbaek. 1999. Antibacterial activity of marine-derived fungi. Mycopathología 143:135-138.
- Cohen J. y Shuval H. (2010). Coliforms, fecal coliforms, and fecal streptococci as indicators of water pollution. Water, Air and Soil Pollut. 2:85-95.
- Croci, L., Suffredini, E., Cozzi, L. y Toti, L. 2012. Effects of depuration of molluscs experimentally contaminated with *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* O1 and *Vibrio parahaemolyticus*. Journal of App Microbiology. 92:460-465.
- Cuña Casasbellas, M.A. 2014. Anatomía e fisiología de moluscos en relación a ingestión de alimento. *En*: Depuración de moluscos. Consellería de Pesca, Marisqueo e Acuicultura (Xunta de Galicia), A Coruña, pp. 24-30.
- Dalsgaard, T. y Thamdrum, B. 2012. Factors controlling anaerobic ammonium oxidation with nitrite in marine sediments. App Env Mic. 68:3802-3808.

Davies, C., Long, J., Donald, M. y Ashbolt, N. 2010. Survival of fecal microorganisms in marine and freshwater sediments. *App Env Mic.* 61:1888-1896.

Dawes, C. J. 2010. *Botánica Marina*. Ed Umusa. México. pp. 671.

Marshall, R. T. (1992) *Standard methods for the examination of Dairy Products*. American Public Health Association. Copyright, Washington, D. C. D'Aoust J., Maurer J. & Bailey J.S. (2001). *Salmonella Species*. In: *Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers*. Doyle M., Beuchat L.R. & Montville T.J. (Eds.) 2d. Ed. ASM Press USA: 141-157.

Dore, W. y Lees, D. 2012. Behavior of *Escherichia coli* and male-specific bacteriophage in environmentally contaminated bivalve molluscs before and after depuration. *App and Env. Mic.* 61(8):2830-2834.

Dsenclos J, Klontz K. Wilder M, Nainan O, Margolis H. & Gunn R.A.1991. A Multistate Outbreak of Hepatitis A caused by the consumption of Raw Oysters. *Am. J. P. Health* 81:1268-1272.

Escobar Jairo. 1983. *Perfil de la Contaminación de las Aguas Continentales Panameñas*. Comisión de Pesca Continental para América Latina (FAO/COPESCAL).

[FAO] Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. *Depuración de bivalvos: aspectos fundamentales y prácticos*. 2010. Roma: FAO. pp 153.

Fernández, B & Brunker, T. 2012. Estudio bacteriológico de bivalvos del golfo de Nicoya, Costa Rica (I parte). *Rev Biol Trop.* 25:101-107.

Fernández S, Narciso A, (2009) Estudio exploratorio de la presencia de actividad antibacteriana en la sangre de la concha prieta *Anadara similis*, Tesis de grado.

Food and Drug Administration (F.D.A.). 2012. *Sanitation of shellfish growing areas. National shellfish sanitation program. Manual of Operations. Part. I*. U.S. Dep.

of Health and Human Services. Public Health Service. Food and Drug Administration, Washington, D.C., U.S.A.

Fujioka, R., Sian-Denton, D., Borja, M., Castro, J. y Morphew, K. 2012. Soil: the environmental source of *Escherichia coli* and enterococci in Guam's streams. *J. Appl. Microbiol. Symp. Suppl.* 85:83-89.

Garay, J., Marín, B., Ramírez, G., Betancourt, J., Troncoso, W. y Gómez, M. 2012. Diagnóstico y evaluación de la calidad ambiental marina en el Caribe y Pacífico colombiano. Red de vigilancia para la protección y conservación de la calidad de las aguas marinas y costeras. Diagnóstico. INVEMAR.

García A., Vargas A., Guzmán I. (2018). Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura (CCAyAC). Método de prueba para la determinación de *V. cholerae* en alimentos y agua para consumo humano. CCAyAC-M002.

Gonzalez Machin, D. 2005. Nociones Básicas de Toxicología Clínica. OPS/OMS. Protocolos para el Diagnóstico de las Enfermedades Profesionales en Colombia. Sistema de Seguridad Social

Harris, L., Tamplin, M., Mason, W., Aldrich, H. y Jackson, K. 2012. Viability of *Vibrio vulnificus* in association with hemocytes of the american oyster (*Crassostrea virginica*). *Applied Environmental Microbiology.* 61(1):52-57.

Herrera, A y Suarez, P. 2012. Indicadores bacterianos como herramientas para medir la calidad ambiental del agua costera. *INCI.* 30(3):171-176.

Hoeller, U., G. Koenig, & A. Wright. 1999. Three new metabolites from marine-derived fungi of the genera *Coniothyrium* and *Microsphaeropsis*. *J. Nat. Prod.* 62:114-118.

Jackson, K.L. y Ogburn, D.M. 1999. Review of depuration and its role in shellfish quality assurance. FRDC Project No. 96/355. NSW Fisheries Final Report Series No. 13. ISSN 1440-3544.

- Jay, J. 2012. Food microbiology. Modern food microbiology. Sexta edición. Aspen Publishers. New York.
- Jones, S., Howell, T. y O'Neill, K. 2012. Differential elimination of indicator bacteria and pathogenic *Vibrio* spp. from eastern oysters (*Crassostrea virginica* Gmelin, 1971) in a commercial controlled purification facility in Maine. *J. Shellfish Research*. 10(1):105-112.
- Kornacki J.L. & Johnson J.L. (2001) "Enterobacteriaceae, Coliforms, and *Escherichia coli* as Quality and Safety Indicators". In: *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 4th ed. Downs F.P. & Ito K. (Eds.) APHA. Washington. 69-82.
- Lancette G.A. & Bennett W. (2001) "Staphylococcus aureus, and Staphylococcal Enterotoxins". In: *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 4th ed. Downs F.P. & Ito K. (Eds.) APHA. Washington. 387-403.
- Lee, R., Lovatelli, A., Ababouch, L. 2008. Bivalve depuration: fundamental and practical aspects. *FAO Fisheries Technical Paper*. No. 51. FAO: Rome. xvii, pp 139.
- Lee, R.J. y Younger, A.D. 2010. Developing microbiological risk assessment for shellfish purification. *Int. Biodeterior Biodegrad*. 50:177–183.
- Lees, D. 2012. Viruses and bivalve shellfish. *International Journal Food Microbiology*. 59(1 & 2):81-116.
- Li, B., Chen, B., Qi, Z., Jiang, Z., Zhang, J. y Fang, J. 2010. Relationship between differential retention of *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* and variations in enzyme activity in the scallop *Patinopecten yessoensis*. *Mar. Pollut. Bull*. 60:1600-1605.
- Lovatelli, A., Vannuccini, S. y McLeod, D. 2012. Current status of world bivalve aquaculture and trade. En: *Estado actual del cultivo y manejo de moluscos*

bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina.

Lovatelli, A., Farías, A. y Uriarte, I. (eds). Taller Técnico Regional de la FAO. 20–24 de agosto de 2010, Puerto Montt, Chile. FAO Actas de Pesca y Acuicultura. No. 12. Roma, FAO. pp. 45–59.

MacFaddin, J. 2010 *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. Segunda edición. Medica Panamericana. Buenos Aires.

Mc. Junkin, F. Eugene, 2010, *Agua y Salud Humana Organización Panamericana de la Salud*, México, Editorial Limusa, Segunda reimpresión. pp. 231.

Madden, R. 2012. Clostridium perfringens as an indicator of hygienic quality of depurated shellfish Journal of Food Protection. 49:33-36.

Madrigal, E., *et al.* 2010. Tasa de filtración del ostión de manglar, (*Crassostrea rhizophorae*, Guilding, 1828), a diferentes salinidades y temperaturas. Rev Bio Trop. 33:77-79.

Marín, B., L. Vivas, W. Troncoso, J. Acosta, A. Vélez y J. Bentancourt. 2004. Diagnóstico y evaluación de la calidad ambiental marina en el Caribe y Pacífico colombiano. Red de vigilancia para la conservación y protección de las aguas marinas y costeras de Colombia. Diagnóstico Nacional y Regional. INVEMAR

Marín, B., Garay, J., Ramírez, G., Betancourt, J., Troncoso, W. y Gómez, L. 2012. Diagnóstico y evaluación de la calidad ambiental marina en el Caribe y Pacífico colombiano red de vigilancia para la conservación y protección de las aguas marinas y costeras de Colombia. Diagnóstico Nacional y Regional. INVEMAR.

Martínez, E., F, Egen., D, Castro., M, Morinigo. P, Romero & J, Barrigo. 2012. Accumulation and depuration pathogenic and indicator organism by the mollusk, under controlled laboratory conditions. Journal Food Protection. 54: 612-618.

- Marshall, R. T. (1992) Standard methods for the examination of Dairy Products. American Public Health Association. Copyright, Washington, D. C. D'Aoust J., Maurer J. & Bailey J.S. (2001). Salmonella Species. In: Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers. Doyle M., Beuchat L.R. & Montville T.J. (Eds.) 2d. Ed. ASM Press USA: 141-157.
- Mesquita, M., Evison, L. y West, P. 2012. Removal of faecal indicator bacteria and bacteriophages from the common mussel (*Mytilus edulis*) under artificial depuration conditions. *Journal Applied Bacteriology*. 70:495-501.
- Oguma, K., Katayama, H., Mitani, H., Morita, S., Hirata, T. y Ohgaki, S. 2012. Determination of pyrimidine dimers in *Escherichia coli* and *Cryptosporidium parvum* during UV light inactivation, photoreactivation, and dark repair. *App Env Mic*. 67(10):4630–4637.
- OPS/OMS 2005. Manual de Vigilancia Epidemiológica. Washington EUA.
- OPS/OMS. 2005. Programa Marco de Atención al Medio para los Sistemas Locales de Salud de las Americas. Hpe/Hsd/Silos-19. Washington D.C, EUA.
- Orozco-Borbón, M.V. y F. Delgadillo-Hinojosa. 2010. Contaminación fecal en sedimentos superficiales de la Bahía de Todos Santos, Baja California. *Ciencias Marinas*. 15(1):47-62.
- Osuna-Valdez, I. 2010. Evolución holocénica de la laguna de La Paz, Baja California Sur, México. Tesis de licenciatura. UABCS. pp 57.
- Otwell, W.S., Rodrick, G.E. y Martin, R.E. (eds). 2010. *Molluscan Shellfish Depuration*. Boca Raton, CRC Press Inc. pp 400.
- Papapetropoulou, M y G. Rodopoulou. 2010. Occurrence of enteric and non-enteric indicators in coastal waters of southern Greece. *Bulletin of Marine Science*. 54(1):63-70.

Power, U. y Collins, J. 2012. Differential depuration of poliovirus, *Escherichia coli*, and a coliphage by the common mussel, *Mytilus edulis*. *Applied Environmental Microbiology* 55:1386-1390.

PROGRAMA DE CONTROL EXTERNO DE CALIDAD SEIMC, AÑO 2006. Recomendaciones sobre bioseguridad en el laboratorio de micobacterias y revisión de la normativa.

Ramos, L., L. Vidal, S. Vilardy y L. Saavedra. 2008. Análisis de la contaminación microbiológica coliformes totales y fecales en la bahía de Santa Marta, Caribe Colombiano. *Acta biol. Colomb.* 13(3):87-98.

Rheinheimer, G. 2010. *Aquatic Microbiology*. 4 Ed. J. Wiley & Sons. New York, 279-281.

Rippey, S. 2012. Infectious diseases associated with molluscan shellfish consumption. *Clinic Microbiol Rev.* 7:419-423.

Rodriguez, M., Rodriguez, G., Serodes, J. y Sadiq, R. 2012. Subproductos de la desinfección del agua potable: Formacion, aspectos sanitarios y reglamentacion. *INCI.* 32(11):749-756.

Sangrungruang, K., Sahavacharin, S. y Ramanudom, J. 2012. Depuration of some Economically important bivalves in Thailand. *ASEAN Food J.* 4(3):101-106.

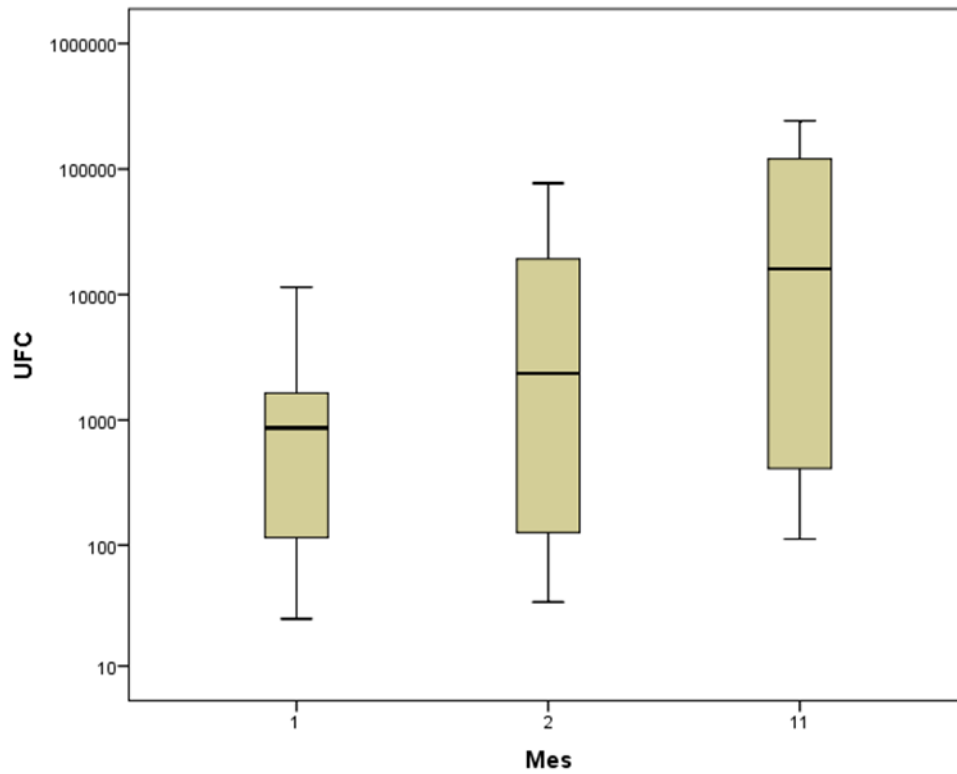
Sayler, G.S., J.D. Nelson Jr., A. Justice Y R.R. Colwell. 2010. Distribution and significance of fecal indicator organisms in the upper Chesapeake Bay. *Applied Microbiology.* 30(4):625-630.

Shuval, H.I. 2019. Studies on bacterial and viral contamination of the marine environment. *Review International Oceanographic Medical.* L:43-50.

Signoretto, C., Burlacchini, G., Pruzzo, C. y Canepari, P. 2012. Persistence of *Enterococcus faecalis* in aquatic environments via surface interactions with copepods. *Applied Environmental Microbiology.* 71(5):2756-2761.

- Smith R., Twedt R. y Krusel L. (2010). Relationships of indicator and pathogenic bacteria. In stream waters. J. Wat. Pollut. Control Fed. 45:1736-1745.
- Sperry, S., G. Samuels & P. Crew. 1998. Vertinoid poliketides from the saltwater culture of the fungus *Tricoderma longibrachiatum* separated from a Haliclona marine sponge. J. Org. Chemist. 63:10 011-10 014.
- Toranzos G. A., E. McFeters, 2010. *Detection of indicator microorganism in environmental freshwather and drink wather*. Manual of environmental microbiology, Chapter 19. pp. 184-189.
- Venkateswaran, K., Takai, T., Navarro, I., Nakano, H., Hashimoto, H. y Siebeling, R. 2012. Ecology of *Vibrio cholerae* non-O1 and *Salmonella* spp. And role of zooplankton in their seasonal distribution in Fukuyama coastal waters, Japan. *Applied Environmental Microbiology*. 55(6):1591-1598.
- Vilariño, M., Parnaudeau, S., Schaeffer, J., Kröl, J., Le Guyader, F. y Romalde, J. 2012. Presencia de virus entéricos en moluscos bivalvos cultivados y salvajes de la Ría de Vigo. XI Congreso Nacional de Acuicultura. Libro de Actas. Tomo II. Vigo, 24-28 de septiembre de 2007. Ppp. 1021-1024.
- Wanke C & Guerrant R. 1987. Viral hepatitis and gastroenteritis transmitted by shellfish and water. *Inf. Dis. Clin. N.* 1:649-664.
- West, P.A. 2010. Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) concept: application to bivalve shellfish purification systems. *Journal Royal Society Health*. 4:133-140.

Gráfico 1. Distribución de UFC entre las categorías de mes.

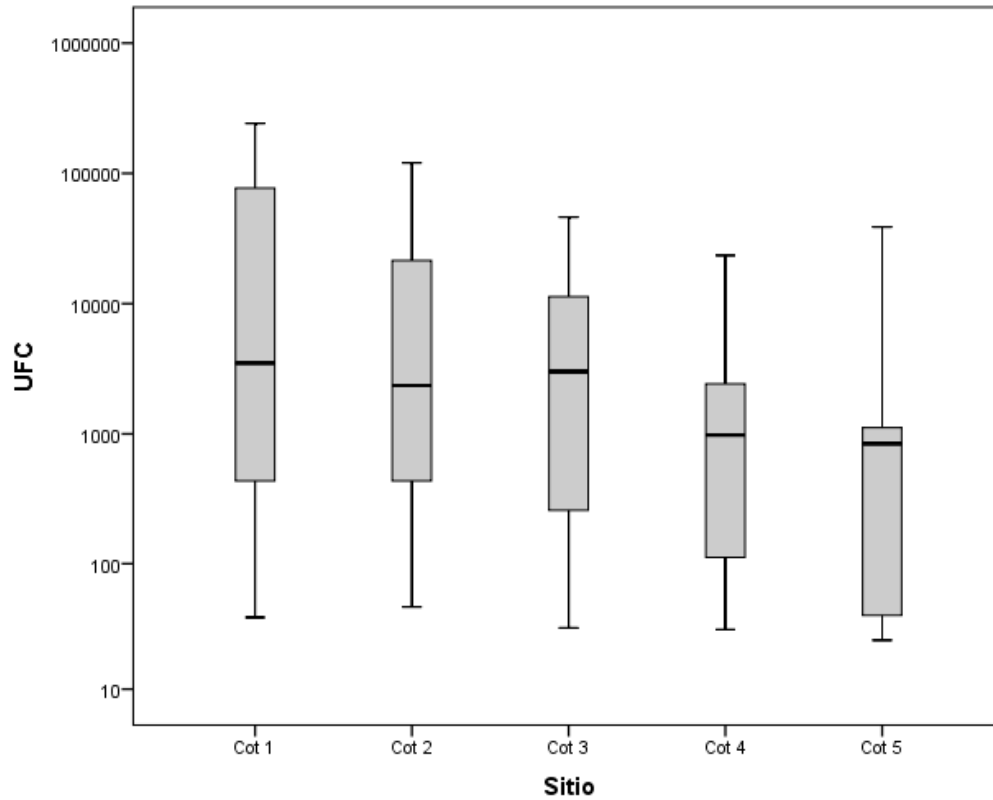


Resumen de contrastes de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de UFC es la misma entre las categorías de Mes.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	.075	Conserve la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es .05.

Gráfico 2. Distribución de UFC entre las categorías de indicador.

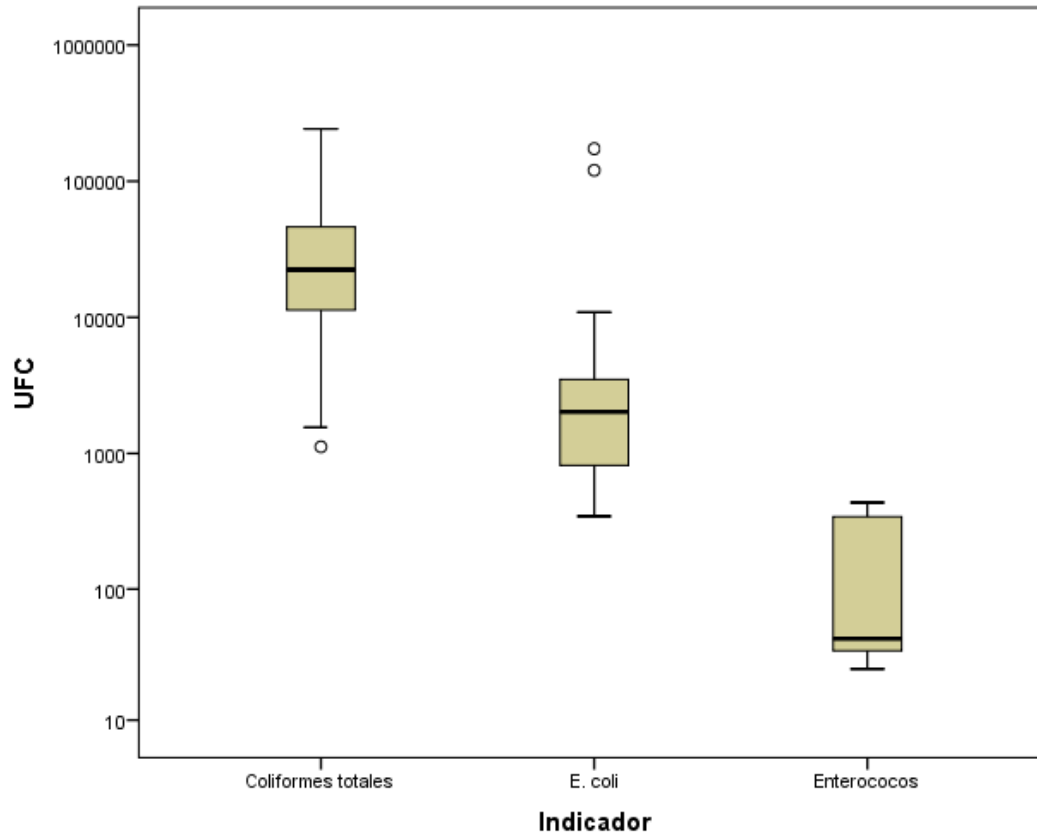


Resumen de contrastes de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de UFC es la misma entre las categorías de Sitio.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	.518	Conserve la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es .05.

Gráfico 3. Distribución de UFC entre las categorías de indicador.

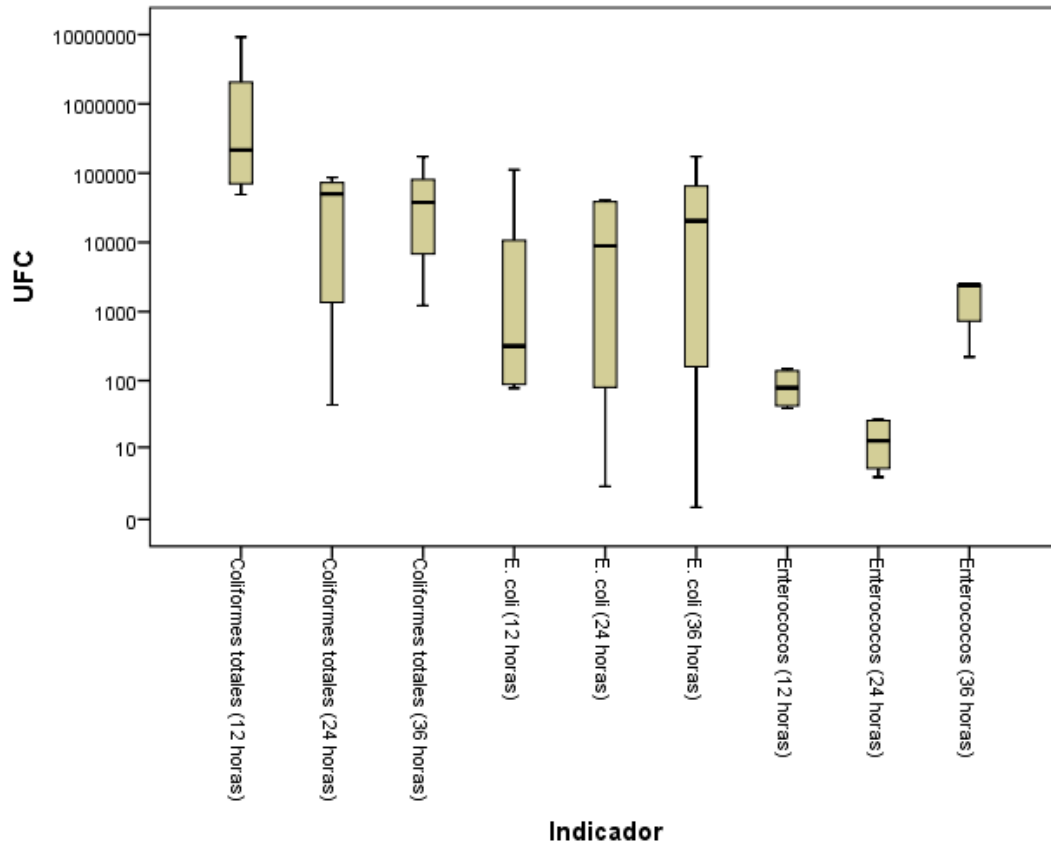


Resumen de contrastes de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de UFC es la misma entre las categorías de Indicador.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	.000	Rechace la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es .05.

Gráfico 4. Distribución de UFC entre las categorías de indicador y las horas del tratamiento.

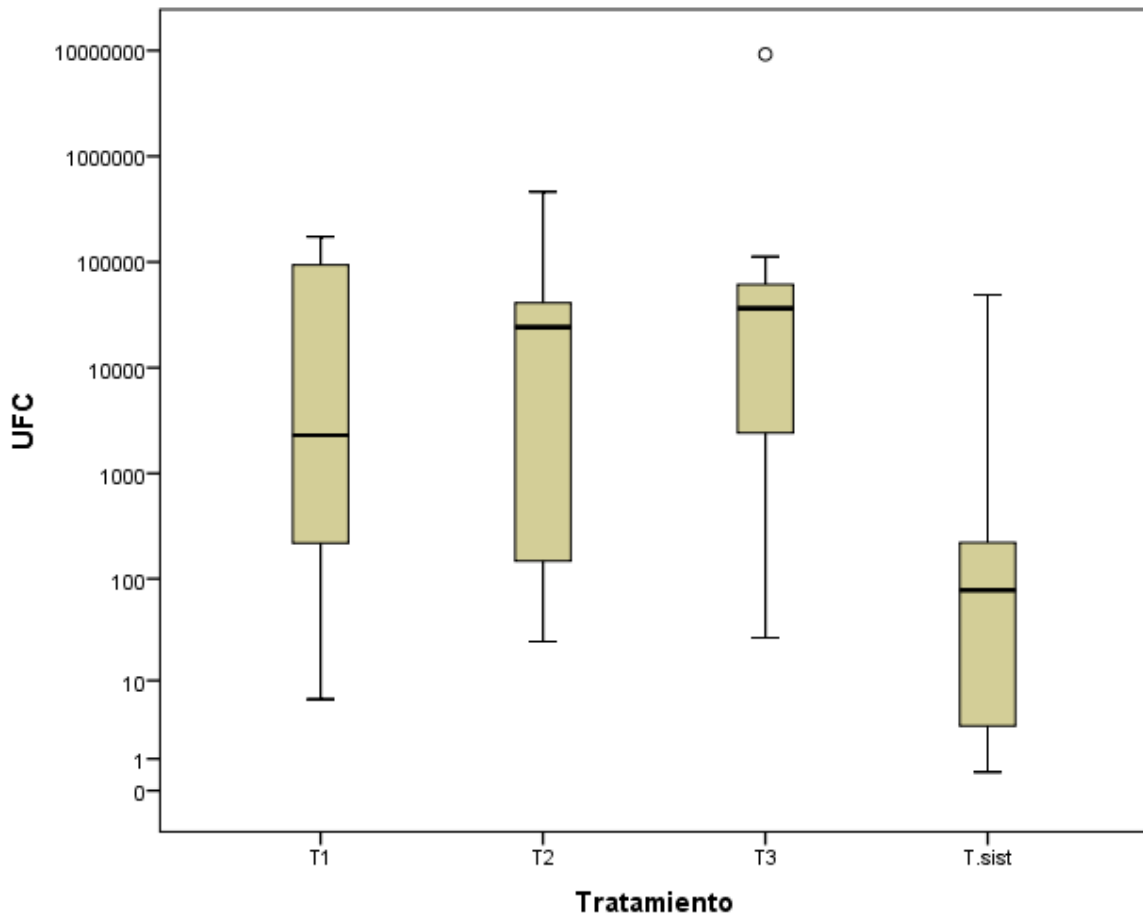


Resumen de contrastes de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de UFC es la misma entre las categorías de Indicador.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	.019	Rechace la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es .05.

Gráfico 5. Distribución de UFC entre las categorías de tratamiento.

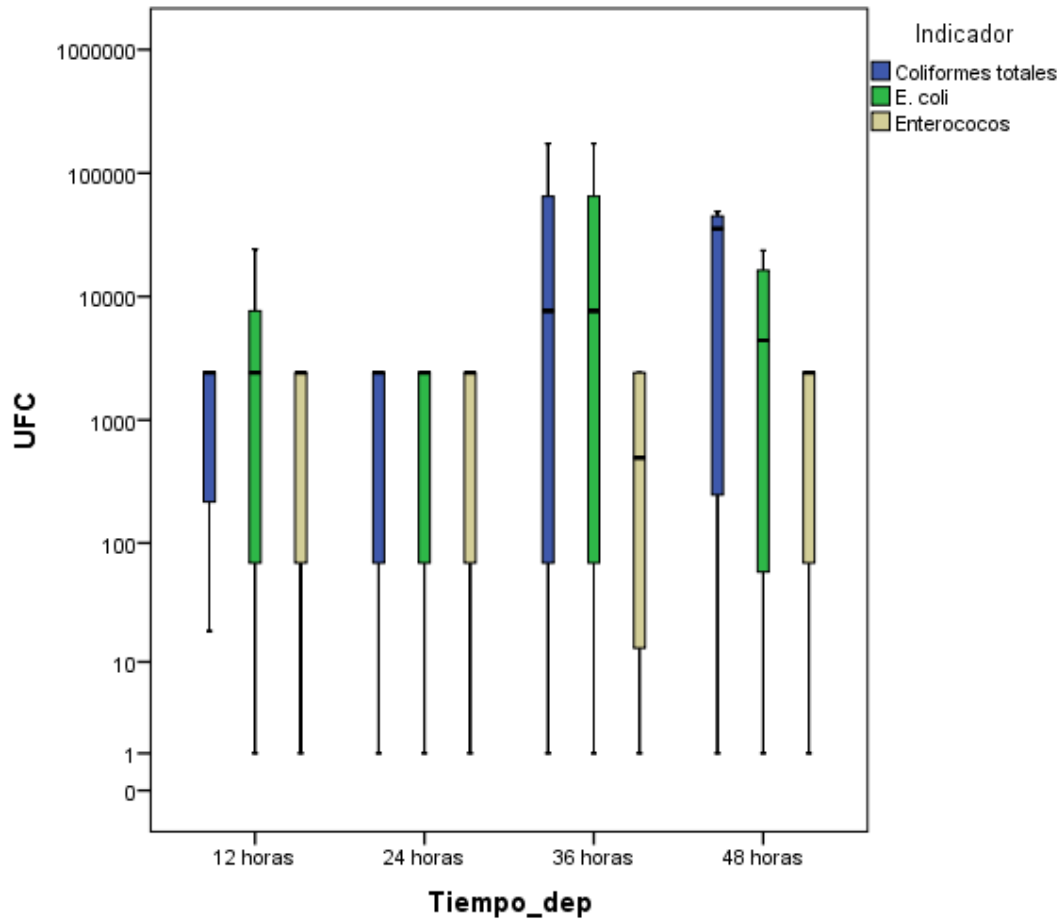


Resumen de contrastes de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de UFC es la misma entre las categorías de Tratamiento	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	.073	Conserve la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es .05.

Gráfico 6. Comparación de los indicadores Coliformes totales, E.coli y Enterococos entre los tratamientos cada 12 horas.

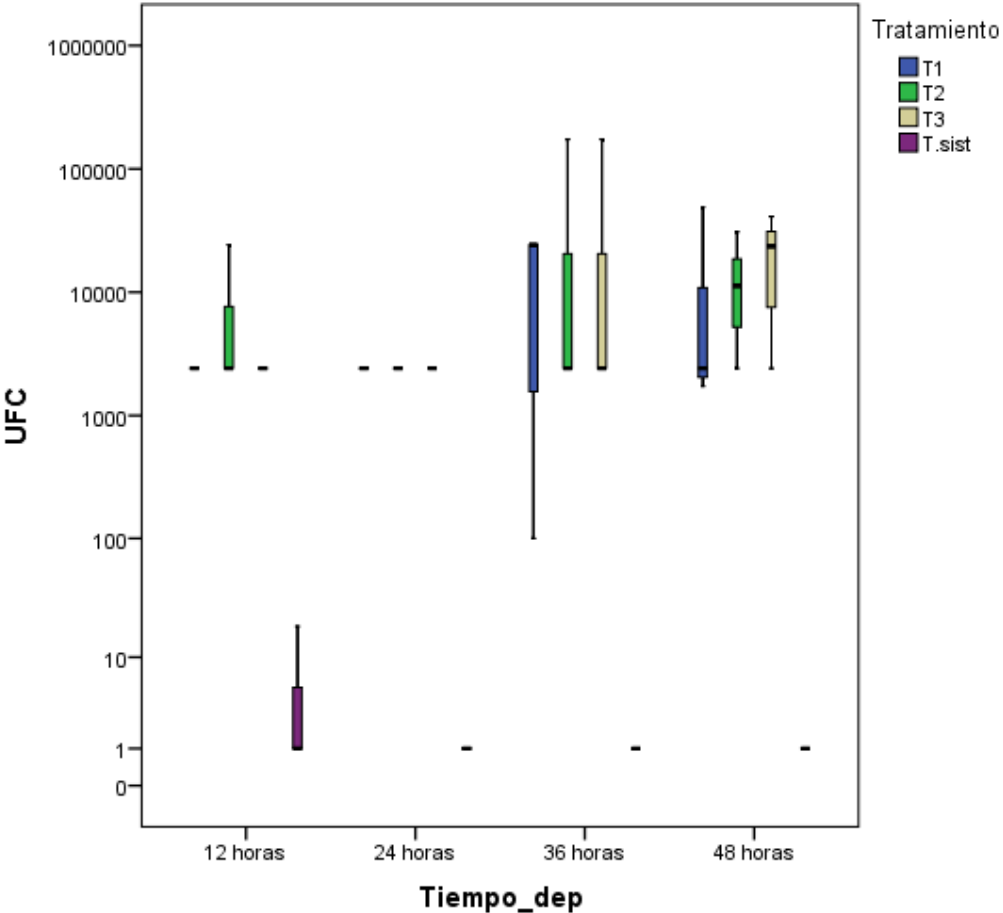


Resumen de contrastes de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de UFC es la misma entre las categorías de Tiempo_dep.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	.672	Conserve la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es .05.

Gráfico 7. Distribución de las UFC entre las categorías de tratamiento.



Resumen de contrastes de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de UFC es la misma entre las categorías de Tratamiento	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	.000	Rechace la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es .05.

Cuadro 1. Resumen del NMP de muestras de agua durante la depuración.

Tratamiento	Coliformes		E. coli		Enterococos		Total de replicas
	Replicas	NMP/100	Replicas	NMP/100	Replicas	NMP/100 ml	
		ml Media Geometrica		ml Media Geometrica		Media Geometrica	
Antes de Depurar	1	75	1	100	1	100	3
T12 horas	3	29930	3	1146	3	335	9
10/90mL T24 horas	3	295587	3	1538	3	339	9
T36 horas	3	44743	3	2816	3	233	9
T48 horas	3	262610	3	439	3	233	9
Total general	13	632945	13	6040	13	1241	39

10/90 mL: dilución, NMP: número más probable, T12-T48: horas de depuración.

Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
La distribucion de UFC es la misma entre la categoria de los indicadores presentes	Kruskal-Wallis para muestras independientes	0.412	Rechazar hipotesis nula

Cuadro 2. Resumen de las UFC/mL en carne de Moluscos Bivalvos (*Anadara tuberculosa*).

Diluciones	Tratamientos de Depuración	Replicas	<i>Aerobios</i>		<i>Coliformes</i>		<i>Pseudomonas</i>		<i>Staphylococcus</i>
			NMP/100 ml Media Geometrica	Replicas	NMP/100 ml Media Geometrica	Replicas	NMP/100 ml Media Geometrica	Replicas	NMP/100 ml Media Geometrica
10^{-1}	Antes	1	101	1	7	1	0	1	29
	12 HORAS	3	66	3	12	3	10	3	157
	24 HORAS	3	269	3	5	3	0	3	237
	36 HORAS	3	353	3	355	3	360	3	502
	48 HORAS	3	652	3	686	3	448	3	423
10^{-2}	12 HORAS	3	12	3	0	3	0	3	88
	24 HORAS	3	69	3	0	3	2	3	51
	36 HORAS	3	353	3	350	3	350	3	438
	48 HORAS	3	428	3	407	3	354	3	366
total general		25	2303	25	1822	25	1524	25	2291

$10^{-1}, 10^{-2}$: diluciones, NMP: número más probable, T12-T48: tiempo u horas de depuración.

Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
La distribucion de UFC es la misma entre la categoria de los indicadores presentes	Kruskal-Wallis para muestras independientes	0.307	Rechazar hipotesis nula

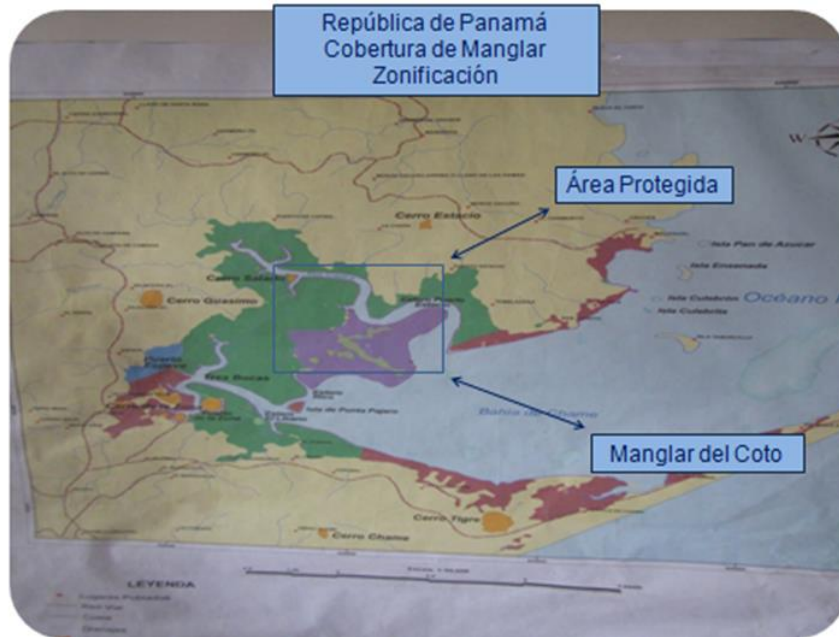


Figura 1. Mapa de zona manglar de coto en el Espavé de Chame, Provincia de Panamá Oeste.



Figura 2. Georreferencia de los sitios de extracción en el Espavé de Chame, Provincia de Panamá Oeste.



Figura 3. Zona de producción el Espavé de chame, Provincia de Panamá Oeste.

Sistema de captación y tratamiento del agua de mar cruda de la Estación de Maricultura del Pacífico

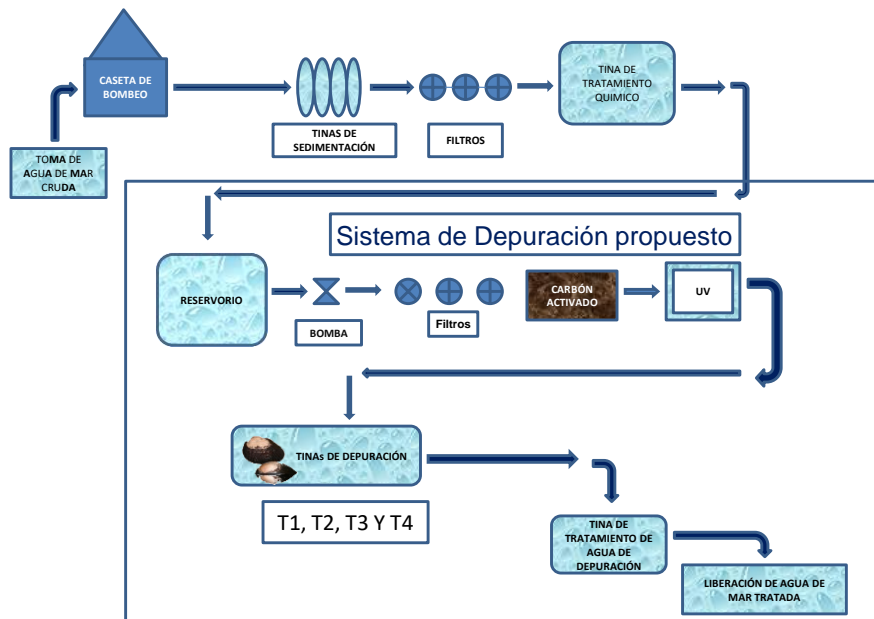


Figura 4. Sistema de toma y filtración de agua de mar de la Estación de Maricultura del Pacífico.

ESQUEMA EXPERIMENTAL DEL SISTEMA DE DEPURACIÓN

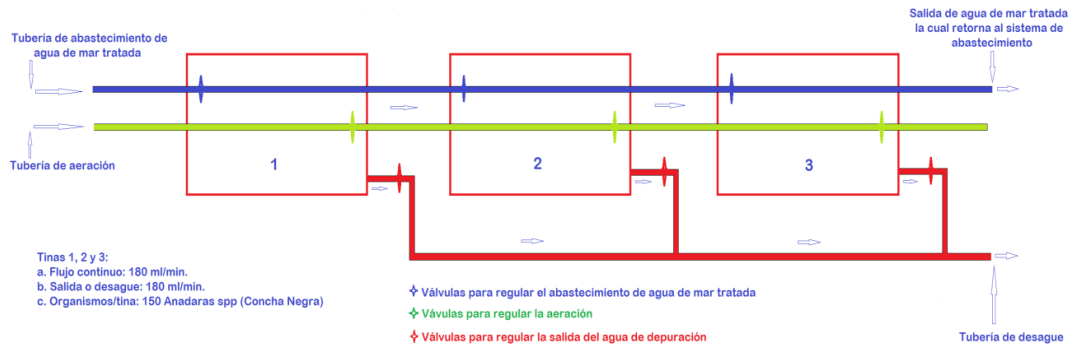


Figura 5. Sistema de depuración.



Figura 8. Calibración del flujo continuo de agua del sistema de depuración.



Figura 9. Muestras de concha negra recién capturadas.



Figura 10. Captura desde coto sitio de extracción.



Figura 11. Conteo e inspección de las condiciones de las conchas negras.



Figura 12. Limpieza de conchas negras previo al inicio de los procesos de depuración.



Figura 13. Selección y organización de concha negra por tina para inicio del proceso de depuración.



Figura 14. Obtención de tejido y líquido intervalvar para los diferentes análisis microbiológicos.

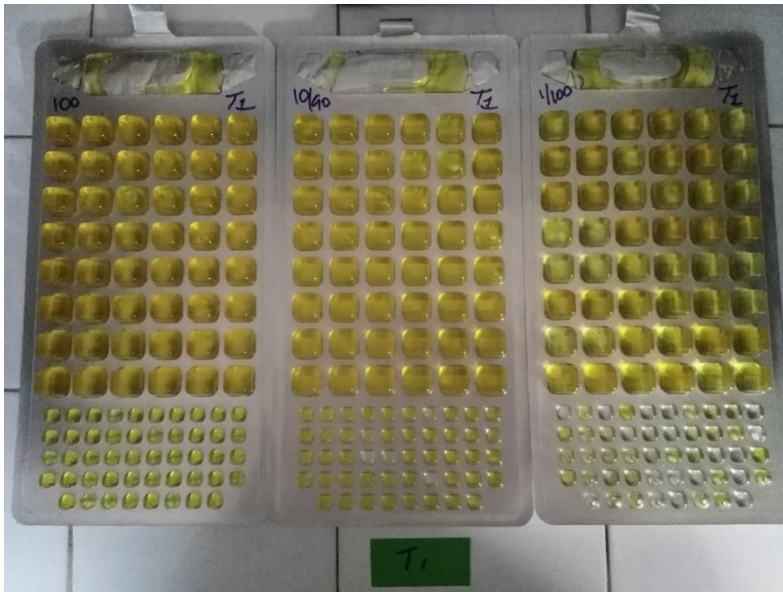


Figura 15. Bandejas quanti-tray para detectar coliformes totales en tinas de depuración.



Figura 16. Bandejas Quanti-Tray para detectar *E. coli* en tinas de depuración.



Figura 17. Bandejas Quanti-Tray con muestra de agua y Enterollert para detectar enterococos en tinas de depuración.

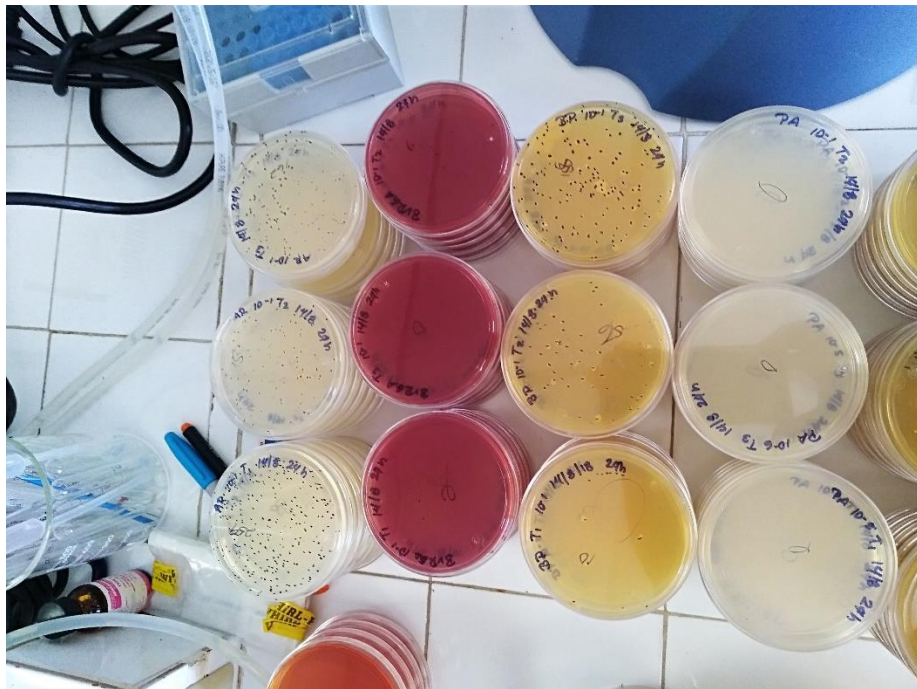


Figura 18. Medios selectivos para determinar UFC/mL en carne de Moluscos Bivalvos (*Anadara* spp.).

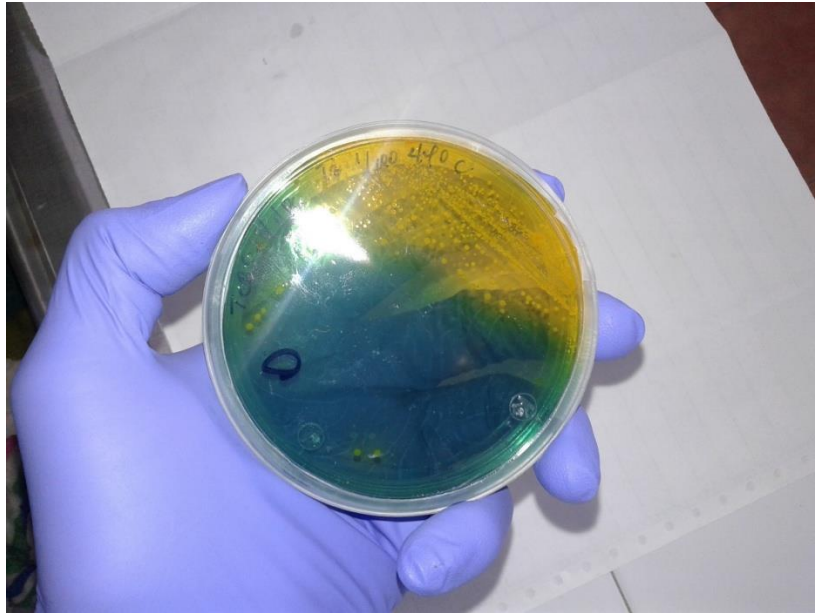


Figura 19. Agar TCBS con presuntas colonias de *Vibrio*.



Figura 20. TSI Y LIA para presuntas muestras de *Vibrio* y *Salmonella*.

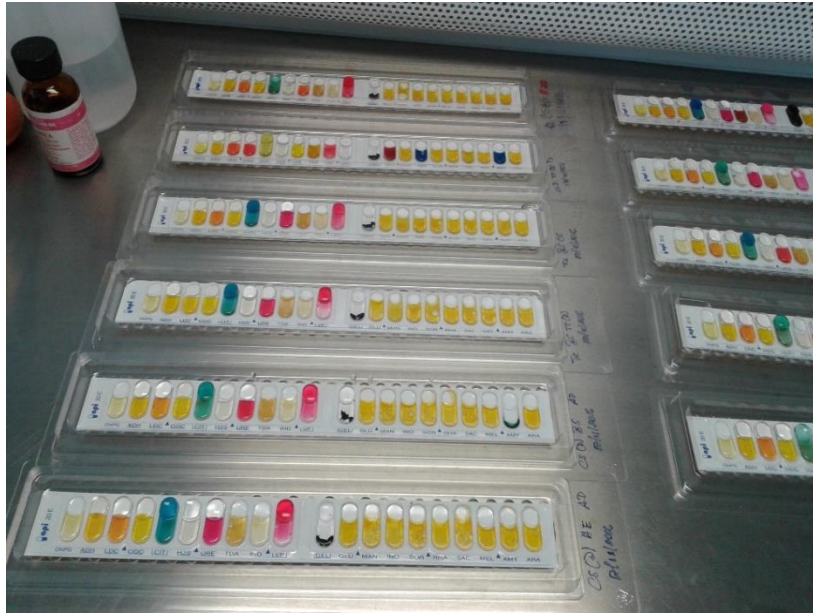


Figura 21. Pruebas bioquímicas API20E para presuntas muestras de *Vibrio* y *Salmonella*.

API 20 E V4.1 [Impresora](#) [Exportar](#) [Nuevo test](#) [Modificar](#)

REFERENCIA FECHA

COMENTARIO
AD TTD HE LIA
15 FEB 2017

BUENA IDENTIFICACION

Galería	API 20 E V4.1		
Perfil	7 1 5 4 5 5 2		
Nota			

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra			
Escherichia coli 1	99.9	0.43	ADH 1%	URE 3%		

Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra			
Salmonella choleraesuis ssp arizonae	0.1	0.0	CIT 75%	H2S 99%	URE 0%	IND 1%

Figura 22. Prueba API 20E para presunto positivo de *E. coli*.

API 20 E V4.1 Impresora Exportar Nuevo test Modificar

REFERENCIA: FECHA: 5/09/17

COMENTARIO:
 [3 BS TTD
 24 NOV 2016]

BUENA IDENTIFICACION

Galería	API 20 E V4.1
Perfil	3 3 0 5 5 7 3
Nota	

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra			
Enterobacter cloacae	95.1	1.0				

Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra			
Enterobacter sakazakii	3.0	0.75	INO 75%	SOR 8%		

Figura 23. Prueba API 20E para presunto positivo de *Enterobacter cloacae*.

Cuadro 2.4: Criterios de clasificación de zonas de producción y recolección de moluscos del programa sanitario nacional de los Estados Unidos

Clasificación	Total coliformes (100 ml agua)		Coliformes fecales (100 ml agua)		Tratamiento necesario
	Media geométrica	Cumplimiento al 90 % ¹	Media geométrica	Cumplimiento al 90 % ¹	
Zonas autorizadas	≤70	≤230	≤14	≤43	Ninguno
Zonas restringidas	≤700	≤2300	≤88	≤260	Depuración o reinstalación en una zona autorizada
Zonas prohibidas	Sin estudio sanitario o incumplimiento de las condiciones para zonas autorizadas o restringidas ²				Recolección prohibida

¹ Valores para la prueba de dilución decimal de 5 tubos – se dan distintos valores de cumplimiento al 90 por ciento para el NMP de 3 tubos y las pruebas de filtración por membrana mTEC.

² Se pueden utilizar aspectos alternativos a la concentración de contaminantes para declarar una zona prohibida.

Figura 24. Criterio clasificación de zonas de producción y recolección de moluscos del programa sanitario nacional de los Estados Unidos (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Depuración de bivalvos: aspectos fundamentales y prácticos. 2010. Roma: FAO.