



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

**Evaluación microbiológica en tres zonas de producción de bivalvos de Panamá durante la estación seca del año 2021, mediante indicadores de contaminación fecal y tres especies de *Vibrios* sp.**

**Presentado por:**  
**Kristal De Hoyos**  
**Katherine Guerra**  
**Kira Vásquez**

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

**Panamá, Rep. de Panamá**  
**2022**

# **DEDICATORIAS**

Quiero dedicar este trabajo primeramente a Dios por permitirme tener salud, perseverancia y determinación para cumplir mis objetivos y metas. A mis padres, hermanas y abuelos por confiar en mí. A mí, por ser perseverante y determinada para completar esta meta, sin importar los obstáculos. A mis amigos y compañeros de universidad y trabajo que creyeron en mí, me apoyaron y me acompañaron durante este camino. A mis compañeras de tesis con las que he compartido este largo proceso.

Kristal De Hoyos

Primeramente, le dedico este trabajo a mi Dios que me dio la fuerza, sabiduría y salud para culminarlo con nuevas esperanzas y fe de que todo lo puedo en Cristo que me fortalece. Segundo a mi familia a mis padres Nelly y Miguel que siempre han estado para mí, brindando su amor, consejo y aliento cuando lo necesitaba, a mis hermanos porque forman parte fundamental en mi vida, los quiero Sara y Miguel. A mi abuela Tomasa por inspirarme con su ejemplo a que todo es posible si crees en el Señor. A toda mi familia, amigos y compañeros que de una u otra forma me apoyaron para culminar este trabajo.

Katherine Guerra

Le dedico este trabajo a mis padres (Olga y César), a mi hermana (Olga) y a mis amistades, los cuales me incentivaron a seguir adelante cuando yo creía que no podía, siempre me han brindado su amor, consejos, apoyo y fuerzas. También, le dedico esta tesis a mis compañeras (Katherine y Kristal) y a mi persona que a pesar de todas las circunstancias que se nos presentaron en el camino ninguna se rindió.

Kira Vásquez

# **AGRADECIMIENTO**

Agradecidas primeramente con Dios por habernos ayudado a culminar una meta importante en nuestras vidas.

Al Ministerio de mi Ambiente por el financiado del proyecto: **“Caracterización genética de virus, bacteriófagos, bacterias y parásitos en tres almejas contaminadas naturalmente en Panamá”**, mediante el convenio N° 041-53-2019 del Fondo de Agua, Área Protegida y Vida Silvestre.

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

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

Estamos agradecidas con el apoyo que el Profesor Fermín y el Profesor Alex nos brindaron siempre en cada uno de los tres puntos de muestreo con la búsqueda de las Almejas.

También, se extiende nuestro agradecimiento a todos nuestros compañeros que nos apoyaron, alentaron e inspiraron para culminar nuestro trabajo.

Por último, estamos profundamente agradecidas con nuestros padres por todo su apoyo para con nosotras, gracias por alentarnos a superar cada obstáculo.

# ÍNDICE GENERAL

<b>DEDICATORIAS</b>	ii
AGRADECIMIENTO	iv
ÍNDICE GENERAL	vi
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	ix
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
CAPITULO I	5
INTRODUCCIÓN Y MARCO TEORICO	5
INTRODUCCIÓN	6
<b>MARCO TEORICO 1. Aspectos Generales De Los Bivalvos</b>	9
<b>1.1 Alimentación de moluscos Bivalvos</b>	10
<b>1.2 Hábitat</b>	11
<b>1.3.1 Donax sp.:</b>	12
<b>1.3.2 Anadara sp.:</b>	13
<b>1.3.3 Leukoma sp.:</b>	13
<b>2. Zonas de producción y extracción de moluscos bivalvos</b>	14
<b>3. Medidas de Control.</b>	21
<b>4. Microorganismos relacionados con los bivalvos</b>	22
<b>4.1 Coliformes</b>	22
<b>4.1.1 Coliformes totales</b>	24
<b>4.1.2 Coliformes termotolerantes (fecales)</b>	25
<b>4.1.3 Escherichia coli.</b>	26
<b>4.2 Vibrio</b>	27
<b>4.2.1 Vibrio cholerae</b>	29
<b>4.2.2 Vibrio parahaemolyticus</b>	31
<b>4.2.3 Vibrio vulnificus</b>	32
<b>OBJETIVOS</b>	33
CAPÍTULO II	34
MATERIALES Y MÉTODOS	34
<b>2.1 MATERIALES</b>	35
<b>2.1 MATERIALES</b>	35
<b>2.1.1 Equipos de laboratorio:</b>	35
<b>2.1.2 Cristalería:</b>	35

<b>2.2 METODOLOGÍA</b>	36
<b>2.2.1 Sitios de Muestreo</b>	36
<b>2.2.2 Diseño experimental</b>	37
<b>2.2.3 Procesamiento de la muestra</b>	37
<b>2.2.4 Análisis Microbiológico</b>	38
<b>2.2.4.1 Prueba Presuntiva – Coliformes Totales</b>	38
<b>2.2.4.2 Prueba Confirmativa</b>	38
<b>Coliforme termotolerantes</b>	38
<b>2.2.4.3 <i>E. coli</i></b>	38
<b>2.2.4.4 Vibrios – Prueba Presuntiva</b>	39
CAPÍTULO III	40
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
<b>3.1 RESULTADOS</b>	41
<b>3.1.1 Distribución de coliformes y <i>E. coli</i> en zonas de producción</b>	41
<b>3.1.2 Distribución de Coliformes y <i>E. coli</i> según los meses de muestreo</b>	43
<b>3.1.3 Distribución de Vibrios de acuerdo con las zonas de producción</b>	46
<b>3.2 DISCUSIÓN</b>	47
<b>3.2.1 Calidad microbiológica de 3 zonas de producción de moluscos bivalvos mediante indicadores de contaminación fecal.</b>	47
<b>3.2.2 Categorización de las tres zonas de producción de bivalvos.</b>	48
<b>3.2.3 Aislamiento e identificación de <i>V. cholerae</i>, <i>V. vulnificus</i> y <i>V. parahaemolyticus</i> en muestra de bivalvos colectada de tres zonas de producción en Panamá.</b>	50
CAPÍTULO IV	53
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	53
<b>4.1 CONCLUSIONES</b>	54
<b>4.2 RECOMENDACIONES</b>	55
BIBLIOGRAFÍA	56
ANEXO	66

# **ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS**

## Figuras

<b>Figura. 1.</b> Distribución de coliformes totales según las zonas de producción.....	41
<b>Figura. 2.</b> Distribución de coliformes termotolerantes según las zonas de producción. .....	42
<b>Figura. 3</b> Distribución de <i>E. coli</i> según las zonas de producción.....	42
<b>Figura. 4</b> Distribución de coliformes totales según los meses de muestreo. ....	44
<b>Figura. 5</b> Distribución de coliformes termotolerantes según los meses de muestreo. .....	44
<b>Figura. 6</b> Distribución de <i>E. coli</i> según los meses de muestreo. ....	45
<b>Figura. 7</b> Porcentaje de <i>Vibrio</i> spp. en Zonas de extracción durante los meses de muestreo. ....	46
<b>Figura. 8</b> <i>Especies de Bivalvos estudiadas A) Anadara sp. B) Leukoma sp. C) Donax sp.</i> ....	68
<b>Figura. 9</b> Diagrama de procesamiento de las muestras de moluscos Bivalvos. ....	68
<b>Figura. 10</b> Resultados positivos y negativos de <i>E. coli</i> en prueba de fluorescencia con EC-MUG. ....	69
<b>Figura. 11</b> Esquema de dilución de muestras de moluscos bivalvos para pruebas de <i>Vibrio</i> sp. ....	69
<b>Figura. 12</b> . APW (Agua alcalina peptonada).....	70
<b>Figura. 13</b> . UFC (Unidades formadoras de colonias) verdes en TCBS (Agar tiosulfato citrato bilis sacarosa) ....	70
<b>Figura. 14</b> UFC (Unidades formadoras de colonias) amarillas en TCBS (Agar tiosulfato citrato bilis sacarosa) ....	70
<b>Figura. 15</b> <i>Vibrio</i> sp. en caldo nutritivo con NaCl 2%.....	70
<b>Figura. 16</b> . <i>Vibrio</i> sp. en agar nutritivo con NaCl 2%. ....	71
<b>Figura. 18</b> UFC (Unidad formadoras de colonias) turquesas en Hardy Chrom <i>Vibrio</i> .....	71
<b>Figura. 17</b> UFC (Unidad formadoras de colonias) violetas en Hardy Chrom <i>Vibrio</i> .....	71

## Tablas

<b>Tabla 1</b> Normativas vigentes en Panamá en materia de sanidad e inocuidad acuicola-pesquera .....	16
<b>Tabla 2</b> Peligros asociados con el consumo de moluscos bivalvos crudos. ....	18
<b>Tabla 3</b> Criterios de clasificación de zonas de producción y recolección de moluscos del Programa Sanitario Nacional de los EEUU. ....	18
<b>Tabla 4</b> Criterio de clasificación de zonas de producción de moluscos en la Unión Europea de acuerdo con el Manual de Buenas Prácticas para el cultivo de moluscos bivalvos. ....	20
<b>Tabla 5</b> Ubicación de las Zonas de muestreo. ....	36
<b>Tabla 6</b> Categoría de la Zona de Producción Según Indicadores Microbiológicos de contaminación fecal.....	43
<b>Tabla 7</b> Resultado de NMP de Coliformes y E. coli en las muestras de Bivalvos durante los meses de muestreo. ....	45
<b>Tabla 8</b> Porcentaje de muestras positivas de Vibrios ( <i>V. cholerae</i> , <i>V. vulnificus</i> y <i>V. parahaemolyticus</i> ) en tres zonas de producción de bivalvos en la estación seca de 2021. ....	46
<b>Tabla 9</b> Cuadro comparativo de categorización de 3 zonas de producción importancia comercial en Panamá.....	49

# RESUMEN

La presencia de bacterias coliformes fecales y *E. coli* en el medio donde se recolectan los moluscos bivalvos es un indicio de contaminación fecal debido a que son organismos que habitan en el tracto digestivo de los humanos y animales de sangre caliente, por lo antes mencionado son importantes en la valoración de la calidad del agua y los alimentos. Otros patógenos de gran importancia que se pueden encontrar y acumular dentro de los moluscos bivalvos, son las bacterias marinas patógenas del género *Vibrio*, de las cuales las dos más importantes en términos de número de infecciones o mortalidad son *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus*. También existe la especie de *V. cholerae* (*V. cholerae* O1/O139 enterotoxigénico) causante del cólera epidémico, potencialmente mortal y del que las personas se infectan después de comer alimentos o beber agua que ha sido contaminada por las heces de personas infectadas. Estas están normalmente relacionadas con contaminación fecal humana, aunque algunas cepas de estos tipos y de los que causan gastroenteritis no colérica (*V. cholerae* no-O1/no-O139), pueden estar de forma natural en el medio marino y se han descrito relacionadas con el consumo de moluscos crudos en los EE. UU. En este estudio se analizaron 45 muestras provenientes de 3 zonas de producción de almejas, playa de Bique, El Espavé y Chinina en los meses de la temporada seca de febrero, marzo y abril. Para evaluar la calidad microbiológica de las 3 zonas de producción, se midieron los indicadores de contaminación fecal utilizando los parámetros establecidos por la Unión Europea, de acuerdo con esto, los sitios de producción de El Espavé y Playa Bique se ubicaron en categoría A y Chinina en categoría C. En cuanto a la identificación y aislamiento de las 3 especies de *Vibrio*, los resultados obtenidos señalan a *V. parahaemolyticus* como la especie de mayor incidencia y distribución, al ser detectado en las 3 zonas de producción, y durante los 3 meses de muestreo de la estación seca, seguido por *V. cholerae* el cual solo fue detectado en una zona de producción (Playa Bique) durante el mes de abril, mientras que *V. vulnificus* no fue aislado ni identificado en ninguna de las 3 zonas durante la estación seca.

**Palabras claves:** coliformes fecales, *E. coli*, *Vibrio*, bivalvos, zonas de producción, calidad microbiológica.

# **ABSTRACT**

The presence of fecal coliform bacteria and *E. coli* in the environment where bivalve mollusks are harvested is an indication of fecal contamination because they are organisms that inhabit the digestive tract of humans and warm-blooded animals, so they are important in assessing the quality of water and food. Other pathogens of great importance that can be found and accumulate in bivalve mollusks are the pathogenic marine bacteria of the genus *Vibrio*, of which the two most important in terms of number of infections or mortality are *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus*. There is also the *V. cholerae* species (enterotoxigenic *V. cholerae* O1/O139) that causes the potentially fatal epidemic cholera, from which people become infected after eating food or drinking water that has been contaminated by the feces of infected persons. These are normally related to human fecal contamination, although some strains of these types and those that cause non-cholera gastroenteritis (*V. cholerae* non-O1/non-O139) can occur naturally in the marine environment and have been described in association with the consumption of raw mollusks in the USA. In this study, 45 samples from 3 clam production areas, Bique beach, El Espavé and Chinina, were analyzed during the dry season months of February, March, and April. To evaluate the microbiological quality of the 3 production zones, indicators of fecal contamination were measured using the parameters established by the European Union. Accordingly, the production sites of El Espavé and Bique beach were placed in category A and Chinina in category C. Regarding the identification and isolation of the 3 *Vibrio* species, the results obtained show *V. parahaemolyticus* as the species with the highest incidence and distribution, as it was detected in the 3 production zones and during the 3 sampling months of the dry season, followed by *V. cholerae* which was only detected in one production zone (Bique beach) during the month of April, while *V. vulnificus* was neither isolated nor identified in any of the 3 zones during the dry season.

**Keywords:** fecal coliforms, *E. coli*, *Vibrio*, bivalves, production areas, microbiological quality.

**CAPITULO I**  
**INTRODUCCIÓN Y MARCO**  
**TEORICO**

**INTRODUCCIÓN** Es de vital importancia prestar atención a las enfermedades causadas por patógenos alimentarios que constituyen a lo ancho del mundo problemas de salud pública. En el caso concreto de los bivalvos, estos pueden estar implicados en la transmisión de enfermedades gastrointestinales como por ejemplo las causadas por *Escherichia coli* (*E. coli*) del tipo enteropatógena, vibriosis como la que produce el cólera, salmonelosis y otras enfermedades, debido a la costumbre de ingerir estos organismos directamente en su concha, crudos o cocidos deficientemente (Quiñones *et al.*, 2000).

Los moluscos bivalvos en general poseen una alimentación por filtración la cual permite que se acumule en ellos una gran cantidad de microorganismos y otros elementos presentes en el ambiente donde los bivalvos se desarrollan (Quiñones *et al.*, 2000), incluso pueden concentrar contaminantes a un nivel superior al de su entorno (Lee *et al.*, 2010). Bofill (2005), indica que una de las principales fuentes de contaminación de microorganismos patógenos en los moluscos bivalvos son las aguas residuales. Por este motivo, es de gran importancia tener en cuenta los peligros para la inocuidad naturalmente presentes en el medio en que se colectan o capturan los moluscos bivalvos (FAO y WHO, 2020).

La presencia de bacterias coliformes fecales y *E. coli* en el medio donde se recolectan los moluscos bivalvos es un indicio de contaminación fecal (Martínez y Villalobos, 2005) debido a que son organismos que habitan en el tracto digestivo de los humanos y otros animales de sangre caliente, son importantes en la valoración de la calidad del agua y los alimentos (Madigan, 2015). Principalmente, *E. coli* es considerada un indicador más específico de contaminación fecal (Lee *et al.*, 2010), ya que es un coliforme cuyo único hábitat es el intestino del humano y animales de sangre caliente, y sobrevive solo un tiempo relativamente breve fuera de él, por eso, es considerado clave entre los coliforme fecal (Madigan, 2015).

Otros patógenos de gran importancia que se pueden encontrar y acumular dentro de los moluscos bivalvos, es la bacterias marinas patógenas del género *Vibrio*, de las cuales las dos más importantes en términos de número de infecciones o mortalidad son *Vibrio parahaemolyticus*, que puede conducir al desarrollo de una gastroenteritis aguda (ACHIPIA, 2017) y *Vibrio vulnificus*, que puede infectar heridas si estas entran

en contacto con el agua de mar o superficies contaminadas por el organismo, y adicionalmente, puede causar septicemia primaria cuando el organismo penetra en el cuerpo a través del tracto intestinal, normalmente después de comer moluscos bivalvos contaminados (Lee *et al.*, 2010).

Aunque la mayoría de estos vibrios se encuentran de forma natural en medios costeros y estuarios, y no están asociados a contaminación fecal, existen las especies de *V. cholerae* (*V. cholerae* O1/O139 enterotoxigénico) causante del cólera epidémico, potencialmente mortal y del que las personas se infectan después de comer alimentos o beber agua que ha sido contaminada por las heces de las personas infectadas (CDC, 2019; Deen *et al.*, 2020). Estas están normalmente relacionadas con contaminación fecal humana, aunque algunas cepas de estos tipos y de los que causan gastroenteritis no colérica (*V. cholerae* no-O1/no-O139), pueden estar de forma natural en el medio marino y se han descrito relacionadas con el consumo de moluscos crudos en los EEUU (Lee *et al.*, 2010).

El CDC estima que cada año en los Estados Unidos (EEUU) se enferman aproximadamente 80000 personas y mueren 100 a causa de la vibriosis causada por bacterias del género *Vibrio* (CDC, 2019), las cuales se pueden encontrar en altas densidades en el ecosistema marino y han sido extensamente estudiados en los sistemas costeros por su importancia medioambiental e incidencia en la extracción de moluscos (Thompson y Polz, 2006).

Es por eso, que para evitar el consumo de moluscos contaminados con microorganismos, metales y virus que puedan causar infecciones e intoxicaciones alimentarias, algunos países han elaborado Códigos de Buenas Prácticas de Producción Acuícola de los Moluscos Bivalvos, en donde se incluye: la selección adecuada del área de cultivo o cosecha, programas de monitoreo y control del agua y alimentos, inspección final del producto, programas de entrenamiento para personal involucrado y establecimiento de estándares permisibles.

Algunos estudios previos como los de Saldaña *et al.* (2006), Gómez *et al.* (2016) y Garrido *et al.* (2018), han determinado la calidad microbiológica de los moluscos bivalvos extraídos en las principales zonas de producción de la provincia de Panamá y Panamá Oeste, y a su vez, categorizado dichas zonas al analizar muestras de *Donax*

*punctatostriatus* (Chinina), *Leukoma asperrima* (Playa Bique) y *Anadara tuberculosa* (El Espavé). Estos estudios clasificaron a las zonas de Producción de Chinina y Playa Bique en la categoría B en el año 2006 y en el año 2016, indicando que los bivalvos obtenidos en estas zonas deberían ser sometidos a proceso de depuración antes de ser consumidos, mientras que, en el año 2018, playa Bique descendió a categoría C (no se pueden consumir) y Chinina se mantuvo en la categoría B, mientras que El Espavé durante los años 2006, 2016 y 2018 se mantuvo en categoría A, indicando que los moluscos obtenidos en esta zona pueden ser consumidos directamente de su concha. Utilizando como regencia de categorización y los Criterios para la clasificación de zonas de producción de moluscos, y la Norma de la Unión Europea (Lee *et al.*, 2010; Martínez y Yeomans, 2014; SERNAPESCA, 2010).

Sin embargo, no hay vigilancia o monitoreo que brinde informes periódicos sobre la calidad microbiológica de los moluscos bivalvos de amplio consumo en Panamá y de sus zonas de producción que permita establecer una clasificación de las mismas, y a su vez, detectar a tiempo alguna variación de la calidad del agua y sedimento en donde estos organismos viven hasta que son extraídos para su consumo; tomando en cuenta que esta actividad es realizada de forma artesanal por las comunidades de pescadores de la zona y en algunos casos la actividad es meramente un medio de subsistencia ya que los moluscos bivalvos son extraídos con fines comerciales (Rivero, 2009).

Debido al riesgo a la salud relacionado con el consumo de los moluscos bivalvos, la presente investigación evaluó la calidad sanitaria de este productos marino de amplio consumo en Panamá, utilizando el grupo de los coliformes termotolerantes y *E. coli* como indicadores de contaminación fecal y a las bacterias vibrios marinas como *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* y *V. cholerae*, por el riesgo a la salud que estas representan, y además, se identificó la calidad de las zonas de producción de los bivalvos *Donax* sp., *Leukoma* sp. y *Anadara* sp. al categorizar las zonas de extracción de Playa Bique, Playa de Chinina, y El Espavé, respectivamente, con la intención de contribuir a proporcionar datos para futuras evaluaciones y conservación de estas zonas de producción.

## MARCO TEORICO **1. Aspectos Generales De Los Bivalvos**

La clase Bivalvia es una de las seis clases de moluscos y comprende animales encerrados en dos valvas (Gosling, 2004; Helm *et al.*, 2006; Recio, 2016). Son conocidos por algunos autores como lamelibranquios o pelecípodos y existen más de 15000 especies de bivalvos, todos acuáticos, abarcando especies marinas y de agua dulce. Su cuerpo está comprimido lateralmente, protegidos por una concha bivalva (dos placas), de igual o diferente tamaño que pueden o no cerrarse completamente sobre las partes blandas del interior (Helm *et al.*, 2006), las cuales están unidas dorsalmente por un ligamento elástico y articuladas mediante dientes que constituyen la charnela (bisagra). Las valvas se cierran y abren por medio de la acción combinada de los músculos aductores y del ligamento (Trigo, 2019).

Las valvas están formadas principalmente de carbonato cálcico, calcita o aragonita, las cuales son formas cristalinas del carbonato de calcio (Recio, 2016) y tienen tres capas, la capa interna o nacarada, la capa intermedia o brillante que forma prácticamente la totalidad de la concha, y la capa externa o periostraco, una capa pardusca y áspera que los animales más viejos suelen perder debido a la abrasión o al desgaste (Helm *et al.*, 2006). La concha (valvas) y el manto son dos partes de los bivalvos que están estrechamente unidas. Por un lado, el manto es una fina membrana que cubre el cuerpo del animal y se encarga de secretar el material con el que se forma la concha (Recio, 2016). Adicionalmente, se encarga de producir el ligamento que hará de bisagra entre las dos valvas. También el manto secreta una sustancia quitinosa de composición compleja, la conquiolina, que se deposita sobre el estrato calcáreo formando un estrato orgánico denominado periostraco, donde su función en esencia es evitar la disolución de la concha en ambientes ácidos (Darrigran, 2013).

El estilo de vida de estos animales hace que muchos de sus órganos estén menos desarrollados que en otros tipos de moluscos. El ejemplo más claro lo tenemos en el sistema nervioso. No tienen un cerebro definido, solo una serie de pares de ganglios conectados entre sí encargados de controlar la cavidad del manto (Recio, 2016). Son exclusivamente acuáticos, marinos, dulceacuícolas. Carecen de cabeza diferenciada (acéfalos), de tentáculos cefálicos, faringe, mandíbula y de rádula. Son organismos poiquilotermos, es decir, que su temperatura corporal depende de la temperatura del

ambiente, ya que no tienen capacidad de termorregulación, salvo el cerrar sus valvas durante los períodos de bajar que les confiere cierta estabilidad térmica en esos períodos (Martínez y Yeomans, 2014).

Los diferentes modos de vida que se dieron a lo largo de la evolución del grupo están relacionados con la especialización de su alimentación filtradora que le ha permitido colonizar nuevos nichos. Así, podemos encontrar: bivalvos epifaúnicos que son aquellos que están fijados al sustrato (sésiles) o que viven libremente sobre él (vida libre) y bivalvos infaúnicos los cuales viven enterrados en sustratos sedimentarios (Trigo, 2019).

Los moluscos conforman una importante fuente de proteínas, minerales y vitaminas (Darrigran, 2013). Sin embargo, la mayoría de los bivalvos son filtradores, esto significa, que se alimentan del plancton y de la materia orgánica que se encuentre suspendida en los cuerpos de agua en los que habitan (Trigo, 2019). Debido a esto, si llegan a estar en contacto con elemento nocivo que se encuentren en disolución o suspensión en el agua, pueden acumularse y concentrarse en sus tejidos y órganos, convirtiéndose de este modo, en una fuente de infección para quienes los consuman. Esto afecta al hombre, principalmente teniendo en cuenta que los consumos de estos moluscos se realizan en muchas ocasiones crudos o con escasa cocción (Lee *et al.*, 2010).

Entre los elementos nocivos que se pueden encontrar en los moluscos bivalvos filtradores, podemos mencionar: bacterias (que causan gastroenteritis o cólera), virus (que causan hepatitis A y gastroenteritis), sustancias químicas (metales pesados como cadmio o plomo) y biotoxinas como la floración de algas tóxicas, como las comúnmente llamadas “marea roja” (Darrigran, 2013; Gonzalo, 2016).

### **1.1 Alimentación de moluscos Bivalvos**

De acuerdo con Helm y col. (2006), los bivalvos como mecanismo de alimentación, filtran su alimento, principalmente organismos vegetales microscópicos llamados fitoplancton. Otras fuentes de alimentación pueden ser importantes, como las finas partículas de materia orgánica muerta (detritus) con bacterias asociadas y materia orgánica disuelta (Trigo, 2019).

Además, Helm y col. (2006), explican que los moluscos bivalvos poseen *ctenidios* o branquias que en juveniles y adultos están bien desarrollados y ejercen la doble función de alimentación y respiración, adicionalmente describe que estos están cubiertos de cilios (diminutas prolongaciones filamentosas móviles) cuyos latidos o movimientos coordinados, inducen una corriente de agua que es absorbida a través de la abertura o sifón inhalante, pasa por las branquias (*ctenidios*) las cuales recogen el plancton y lo adhieren a la mucosa, y finalmente, el agua vuelve al medio a través de la abertura o sifón exhalante. Los filamentos de mucosa cargados de alimento pasan por surcos especiales en las branquias hacia el interior hasta llegar a los palpos labiales que dirigen el alimento a la boca y lo introducen. Los bivalvos pueden seleccionar parte del alimento y periódicamente los palpos rechazan pequeñas masas de alimento las cuales son expulsadas de la cavidad paleal a menudo por un batido vigoroso de las valvas, como pseudoheces (Helm et al., 2006).

Por otro lado, Gosling (2004), señala que la temperatura tiene una marcada influencia en la alimentación por filtración de los bivalvos desde el punto de vista metabólico el cual es medido por el consumo de O<sub>2</sub>, ya que indica que este aumenta con el incremento de temperatura. Esto conlleva a un aumento en los niveles de consumo de alimento para evitar la pérdida rápida de peso a altas temperaturas. Debido a que son animales filtradores y que pueden acumular contaminantes en sus tejidos, los bivalvos pueden ser utilizados como bioindicadores de contaminantes orgánicos como inorgánicos (Trigo, 2019).

## **1.2 Hábitat**

Los bivalvos han colonizado prácticamente cualquier hábitat acuático, aunque mayormente viven enterrados en sedimentos en el fondo del mar o en ambientes de agua dulce, la mayoría de ellos habitan la zona de los trópicos, así como aguas templadas. Sin embargo, los bivalvos también pueden vivir en condiciones extremas y se conocen unas 140 especies que desarrollan su vida en el Ártico, mientras que otras pocas especies son muy sensibles a su hábitat y solo se encuentran en ecosistemas muy concretos (Recio, 2016).

De acuerdo con Darrigran (2013), las características de los bivalvos y el tipo de hábitat asociado con las mismas están interconectadas en tres aspectos importantes, los cuales son: forma de vida, forma de locomoción o asentamiento y forma de alimentación. Por lo tanto, de acuerdo con su forma de vida, una división común de los bivalvos es: excavadores de sustrato blando, perforadores, habitantes superficiales fijados al sustrato duro, habitantes libres de superficie. También, explica que la mayoría de los bivalvos tienen una vida sedentaria o incluso sésil y en ocasiones pasan toda su vida en la misma área donde se asentaron en su etapa juvenil. Muchos de estos viven en la zona intermareal, donde solo hay agua cuando la marea es alta, pero los sedimentos se mantienen húmedos siempre o en hábitats bentónicos blandos donde excavan y se entierran a diferentes profundidades. Aquellos bivalvos que viven inmediatamente por debajo de la superficie se les clasifica como infaunales superficiales, mientras que a los que viven a varios centímetros de profundidades se les clasifica como infaunales profundos. Estos bivalvos infaunales poseen los músculos aductores anteriores y posteriores bien desarrollados, de tamaño semejante, mientras que en los bivalvos que viven adheridos al sustrato, llamados epifaunales, poseen pie y extremo anterior reducidos, lo cual conduce a su vez a una reducción del músculo aductor anterior. Por otro lado, los que viven libres sobre el sustrato o nadadores, incluso pueden perder el músculo aductor anterior.

## **Géneros de bivalvos**

### **1.3.1 *Donax* sp.:**

Los bivalvos del género *Donax* pertenecen a la familia Donacidae y también, se conocen como almejas de frijol, almejas Coquina y conchas de cuña. Son almejas pequeñas y medianas que tienen un perfil triangular, y algunas tienen un contorno más alargado. Ambas valvas son iguales en tamaño y forma (equivalva). Su extremo anterior es largo y estrechamente redondeado y el extremo posterior es muy inclinado. El exterior de la concha puede ser liso o esculpido con finas crestas radiales. La superficie exterior de la concha es brillante y el interior es liso, brillante y el margen interior puede ser dentado (Donax Shell of the Donacidae Family, 2018).

Las *Donax* se encuentran en zona intermareal y son una de las conchas más comunes en playas arenosas, barridas por el oleaje. Están bien adaptadas a la zona de fuerte oleaje, ya que son excavadores rápidos y pueden desplazarse cuando sea necesario, utilizando la energía de las olas para moverse rápidamente. Para desplazarse, estas almejas usan el músculo de sus pies para impulsarse desde el fondo, hacia la columna de agua, extender su sifón y pie, que se usa como una vela para empujarse hacia la playa. Son únicos en esta habilidad. Las *Donax* se alimentan por filtración, comen plancton suspendido en la columna de agua. A su vez, son cazadas por aves costeras, cangrejos, peces y mamíferos, incluidos los humanos. Se encuentran en todo el mundo, principalmente en aguas tropicales y subtropicales (Donax Shell of the Donacidae Family, 2018).

### **1.3.2 *Anadara* sp.:**

Son conchas grandes equivalvas, de formas oblicuamente ovaladas, relativamente gruesas. El margen dorsal es angulado, tienen valvas que muestran entre 33 a 37 costillas, cara interna de color blanco con tono rosado, cubierto por un periostraco piloso que va desde café oscuro hasta negro. Sus branquias además de su función respiratoria también son filtradores, participando en la obtención de alimento (fitoplancton). Viven en sustratos suaves y fangosos, arcillosos o limo-arcillosos y se encuentran asociados a las raíces del mangle enterradas a profundidades de 10 a 30 cm. Esta especie está distribuida por la parte externa de los manglares del Pacífico de Costa Rica, desde el Golfo de California hasta Tumbes (Perú) (ARAP, 2012).

### **1.3.3 *Leukoma* sp.:**

Concha robusta, área (lúnula) por delante del vértice de las valvas (umbo) bastante pequeña, área por detrás de dicho vértice (escudete) poco visible, superficie externa con diseños entrelazados de color café y púrpura, sobre un fondo blanquecino a parduzco, cubierta por pequeñas costillas radiales poco espaciadas, cruzadas por surcos concéntricos. Vive en varios tipos de fondos blandos, desde la zona intermareal hasta unos 400 m de profundidad (Díaz *et al.*, 2014).

## **2. Zonas de producción y extracción de moluscos bivalvos**

Según ELIKA (2012), las zonas de producción de moluscos bivalvos son zonas marítimas, de lagunas o de estuarios, donde se encuentran bancos naturales o de cultivo de moluscos bivalvos que son recolectados. Por otro lado, las zonas de reinstalación son aquellas similares a las anteriores, pero destinadas exclusivamente a la depuración natural de moluscos bivalvos vivos, por lo que deben estar claramente delimitadas y señalizadas por boyas, postes o cualquier otro material fijo. La Autoridad competente debe determinar la ubicación y los límites de las zonas de producción y de reinstalación de moluscos en el litoral, en relación con la calidad de las aguas y el grado de contaminación fecal. Para ello, se deben realizar análisis y muestreos periódicos en dichas zonas, haciendo un seguimiento del grado de contaminación existente en cada una de ellas, y emitiendo una clasificación sanitaria de las zonas de producción ELIKA (2012).

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 o ligeramente cocidos. Dado que son filtradores, los moluscos concentran contaminantes a un nivel muy superior al de las aguas marinas que los circundan (Lee *et al*, 2010). Además, es de gran importancia la identificación y vigilancia de las zonas de cría para controlar los peligros que puedan alterar la inocuidad de los moluscos bivalvos. Por tal motivo, es tarea de las autoridades competentes en cooperación con los pescadores y productores primarios, la identificación, clasificación y vigilancia de estas áreas en las cuales se deberían realizar estudios de la zona de cría, del litoral y de la zona terrestre de captación a fin de determinar cuáles son las fuentes de contaminación doméstica e industrial que pueden afectar a la calidad de las aguas de la zona de cría, así como de los moluscos bivalvos (Lee *et al.*, 2010).

Dichas fuentes de contaminación pueden ser las salidas de redes municipales de cloacas, efluentes industriales, aguas residuales de minas, contaminantes geofísicos, recintos de retención de animales domésticos, centrales nucleares, refinerías u otras

(FAO, 2018). Se deberían realizar exámenes con frecuencia aceptables y reevaluar las fuentes de contaminación periódicamente para determinar cualquier variación de sus efectos en la zona de cría. Para determinar los niveles aceptables se utilizan como guía las normas alimentarias de la FAO, de la OMS u otras normas internacionales o nacionales (FAO y OMS, 2005). El organismo oficial competente debe definir claramente las zonas de cría clasificadas como: zonas de clase A: idóneas para la recolección, destinada al consumo humano directo; zonas de clase B: aquellas en las que pueden recolectarse moluscos bivalvos vivos que únicamente pueden comercializarse para el consumo humano tras su tratamiento en un centro de depuración o su reinstalación en aguas aceptables, u otras formas para reducir o limitar organismos específicos, como por ejemplo el tratamiento térmico, la radiación, la presión hidrostática, o la congelación rápida individual de modo que cumplan las normas sanitarias exigidas en las zonas de clase A; zonas de clase C: en las cuales pueden recolectarse moluscos bivalvos vivos que únicamente pueden comercializarse para el consumo humano tras su reinstalación durante un período prolongado, de modo que cumplan las normas sanitarias exigidas en las zonas de clase A y finalmente, las no idóneas para el cultivo o la recolección de moluscos bivalvos (Euskadi, 2018). Las referencias de los criterios para clasificar las zonas de producción de cultivo de moluscos bivalvos en EEUU y la Unión Europea, se muestran en las Tablas 3 y 4, respectivamente.

En el Código de Prácticas para el pescado y los productos pesqueros FAO y OMS (2020), se describe un programa de requisitos previos que comprende directrices tecnológicas y las condiciones esenciales de higiene para la producción de pescado y productos pesqueros (entre ellos los moluscos bivalvos) que resulten inocuos para el consumo humano y que cumplan con las restantes condiciones indicadas en las normas del Codex Alimentarius para los productos correspondientes.

En cuanto a la legislación sobre la acuicultura, en la mayoría de los países se contempla en las leyes generales de pesca destinadas al ordenamiento de la actividad pesquera y acuícola, y en algunos casos, se norma la extracción y el desarrollo de la acuicultura para los moluscos. En el área de la sanidad e inocuidad de los productos provenientes de la extracción o el cultivo como son los moluscos bivalvos, pocos

países presentan normativas específicas como Brasil, Chile y México. En cada país existen normas, acuerdos y procedimientos que ya se aplican a diversos aspectos de la acuicultura y su cadena de valor. En este sentido, es necesario que la Autoridad Competente vigile el cumplimiento de su reglamentación para garantizar la sanidad e inocuidad de sus productos (Martínez y Yeomans, 2014).

Panamá es miembro de varias organizaciones internacionales que velan por la inocuidad de alimentos y regulan la sanidad en actividades de pesca y acuicultura (OIRSA, OIE, OSPESCA, FAO, SICA), las cuales, en el ámbito internacional para la exportación de productos del mar, el cumplimiento de sus normas es obligatorio para todos sus países miembros. Las normativas vigentes en sanidad e inocuidad acuícola pesquera en Panamá se mencionan en la Cuadro 1.

**Tabla 1** Normativas vigentes en Panamá en materia de sanidad e inocuidad acuícola-pesquera

País	Número y tipo de normativa	Título
Panamá	Decreto ley 11 de 1959	Ley General de Pesca.
	Ley 44 de 23 de noviembre de 2006.	Ley por la cual se crea la Autoridad de los Recursos Acuáticos de Panamá.
	Decreto Ejecutivo No. 209 de 5 de septiembre de 2006.	Decreto por el cual se regula la presentación de estudios de impacto ambiental.
	El decreto ejecutivo n.º 1 de 3 de enero de 1996 del ministerio de salud	Por medio del cual establece la reglamentación sanitaria de los productos pesqueros y de acuicultura para el consumo humano

El decreto ejecutivo N° 1 de 3 de enero de 1996 del ministerio de salud (MINSA) que establece la reglamentación sanitaria de los productos pesqueros y de acuicultura para el consumo humano, dictamina que no se considera apto para el consumo humano moluscos que provengan de área de pesca prohibida por ser aguas contaminadas, por lo cual, se prohíbe su venta. Sin embargo, no se cuenta con una legislación clara para la inocuidad y clasificación de las zonas de extracción de moluscos bivalvos.

Otros peligros están relacionados con organismos que están presentes de forma natural en el medio marino. Estos peligros incluyen infecciones debidas a bacterias marinos del grupo vibrio patógenos, de las cuales algunas especies se asocian principalmente con enfermedades gastrointestinales (*V. cholerae* y *V. parahaemolyticus*), mientras que otras pueden causar enfermedades no intestinales, como la septicemia (*V. vulnificus*) (FAO, 2003). También, se pueden encontrar biotoxinas producidas por ciertas algas unicelulares que pueden causar distintas formas de intoxicación como, por ejemplo, la toxina paralizante de los moluscos (PSP), la toxina neurotóxica de los moluscos (NSP), la toxina amnésica de los moluscos (ASP) o la toxina diarreica de los moluscos (DSP). Por lo cual, es importante mencionar la vigilancia para determinar el riesgo asociado a la presencia de biotoxinas, la cual puede basarse en una evaluación de la presencia de las algas que producen las toxinas, una estimación directa de las propias biotoxinas en los moluscos o ambos (Lee *et al.*, 2010; Martínez y Yeomans, 2014).

Los contaminantes químicos, como los metales pesados, plaguicidas, organoclorados o sustancias petroquímicas, también constituyen un peligro potencial en algunas zonas, sin embargo, no existen pruebas, ni en informes epidemiológicos ni en la literatura científica, de que las enfermedades provocadas por el consumo de moluscos contaminados con sustancias químicas constituyen un problema significativo. Por otro lado, la identificación y vigilancia de las zonas de cultivo son aspectos importantes y para ello, los indicadores bacterianos de contaminación fecal como los coliformes termotolerantes (anteriormente conocidos como fecales) o la *E. coli*, ayudan a evaluar el riesgo de la presencia de patógenos bacterianos y víricos. La utilización de *E. coli* se considera un indicador más específico de contaminación fecal (Lee *et al.*, 2010). En el cuadro 2, se describen peligros asociados al consumo de moluscos bivalvos crudos.

**Tabla 2** Peligros asociados con el consumo de moluscos bivalvos crudos.

Tipo de peligro		Contaminantes
Infecciones	Bacterias	<i>Salmonella sp.</i> , <i>Shigella sp.</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. vulnificus</i> , <i>V. cholera</i> , <i>Campylobacter sp.</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>E. coli</i>
	Virus	<i>Norovirus</i> , Virus de la hepatitis A. entre otros.
Intoxicaciones	Químicas	Metales pesados: Mercurio (Hg), Cadmio (Cd), Plomo (Pb). Orgánicos: Dioxinas, fenoles policlorados (PCB), Hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH), plaguicidas.
	Biotoxinas	Toxina paralizante de los moluscos (PSP), toxina diarreaica de los moluscos (DSP), toxina amnésica de los moluscos (ASP), neurotoxina de los moluscos (NSP).

Tomado de: Martínez y Yeomans (2014) con modificaciones

**Tabla 3** Criterios de clasificación de zonas de producción y recolección de moluscos del Programa Sanitario Nacional de los EEUU.

Clasificación	Coliformes Totales (100 mL agua)		Coliformes termotolerantes (100 mL agua)		Tratamiento necesario
	Media geométrica	Cumplimiento al 90%	Media geométrica	Cumplimiento al 90%	
Zona autorizada	≤ 70	≤ 230	≤ 14	≤ 43	ninguno
Zona restringida	≤ 700	≤ 2300	≤ 88	≤ 260	Depuración o reinstalación en una zona autorizada

Zona prohibida	Sin estudio sanitario o incumplimiento de las condiciones para zonas autorizadas o restringidas.	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 la prueba de filtración por membrana Mtec. 2. Se pueden utilizar aspectos alternativos a la concentración de contaminantes para declarar una zona prohibida. Tomado de: Martínez y Yeomans (2014) con modificaciones.

En su informe regional de diagnóstico del cultivo y extracción de moluscos en Centroamérica, Rivero (2009), describe que la actividad de extracción de moluscos es realizada de forma artesanal por las comunidades de pescadores de la zona, afirma que incluso en algunos casos la actividad es meramente un medio de subsistencia y es muy común que en la actividad de extracción participen hombres, mujeres y jóvenes. El informe también indica que la extracción y comercialización de moluscos se encuentra escasamente regulada y los controles para garantizar el manejo sostenible y la adecuada distribución y venta del recurso son insuficientes. Esta situación contribuye a la informalidad del mercado, a la inestabilidad en los ingresos de los extractores y a la falta de seguridad para los consumidores. En Panamá, la extracción de moluscos no está regulada ni sujeta a ningún tipo de control, tampoco existen datos de capturas por lo que se desconoce la situación del recurso.

Existen Programas sanitarios que permiten que las áreas sean clasificadas con base en los parámetros de coliformes termotolerantes o *E. coli*, considerando además lo relacionado con biotoxinas marinas (florecimientos de algas nocivas) en diferentes cuerpos de agua dentro de un país. Los siguientes cuadros muestran los ejemplos de los Programas Sanitarios vigentes en la Unión Europea y los EEUU, mismos que el resto de los países deben cumplir cuando se exporta el producto a esos mercados (Martínez y Yeomans, 2014).

**Tabla 4** Criterio de clasificación de zonas de producción de moluscos en la Unión Europea de acuerdo con el Manual de Buenas Prácticas para el cultivo de moluscos bivalvos.

<b>Clasificación de las zonas de producción</b>	<b>Estándar microbiológico por cada 100 g de carne de moluscos bivalvos y de líquido intervalvar.<sup>1</sup></b>	<b>Tratamiento necesario</b>
A	$\leq 230$ NMP <i>E. coli</i> /100 g de carne y <sup>2</sup> líquido intervalvar.	Ninguno
B	Los moluscos bivalvos de estas zonas no deben superar los límites de una prueba de cinco tubos, tres diluciones, NMP de 5600 <i>E. coli</i> /100 g de carne y líquido intervalvar en más de 10% de las muestras. <sup>3</sup>	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 <i>E. coli</i> /100 de carne y líquido intervalvar.	Reinstalación durante un período largo o cocinado según método autorizado
Prohibida	$> 46.000$ <i>E. coli</i> /100 g de carne y líquido intervalvar.	No se permite la cosecha.

1. El método de referencia en la reglamentación se refiere a la ISO TS 16649-3. 2. Por referencia cruzada al Reglamento (CE) No 854/2004, vía Reglamento (CE) No 853/2004, con el Reglamento de la Comisión (CE) No 2073/2005 sobre criterios microbiológicos para alimentos. 3. La tolerancia del 10% se permite para un período de transición según el Reglamento (CE) No 1666/2006. Tomado de: Martínez y Yeomans (2014) con modificaciones.

De acuerdo con SERNAPESCA (2015) en su Programa de Sanidad de Moluscos Bivalvos, indica que las zonas de producción de moluscos bivalvos Tipo A puede ser para consumo humano directo en donde los recursos extraídos desde estas zonas pueden ser exportados en estado vivo, refrigerado o procesado, Tipo B para

depuración, reinstalación o aplicación de tratamientos térmicos aprobados y Tipo C será para reinstalación por períodos largos de tiempo o aplicación de tratamientos térmicos aprobados.

Si los resultados de los muestreos periódicos realizados en las zonas de producción indican que no se cumplen las normas sanitarias establecidas para los moluscos, o que puede haber cualquier otro tipo de riesgo para la salud humana, la autoridad competente deberá cerrar la recolección en la zona de producción afectada (ELIKA, 2012).

### **3. Medidas de Control.**

El mejor método para producir moluscos de una manera segura es el cultivo y la recolección en áreas que no estén sometidas a ninguna fuente externa de contaminación, aunque hay que señalar que estas áreas son muy escasas, por lo que generalmente es necesario un proceso posterior de depuración o reinstalación (Lee *et al.*, 2010). La depuración consiste en la inmersión de los moluscos en tanques de agua de mar limpia, en condiciones que permitan maximizar la actividad natural de filtración y reducir así la contaminación, ya que, de esta forma, se produce un efecto de dilución y los moluscos van eliminando de a poco los contaminantes que han ido adquiriendo durante su cultivo (ELIKA, 2012).

La FAO y OMS (2020), indican que, para efectos de determinar la idoneidad de las zonas de cría de moluscos bivalvos desde el punto de vista de la salud pública, el organismo oficial competente debería realizar una clasificación o reclasificación de las zonas de producción a través de una vigila frecuente de *E. coli* y coliformes fecales/termotolerantes con una frecuencia apropiada basada en la probabilidad de contaminación y otras medidas sanitarias de control según correspondan.

Se ha comprobado que si se enfrían los moluscos tan pronto como sea posible después de la recolección y se mantienen a bajas temperaturas (a 10°C o menos) se impide la multiplicación de vibrios patógenos a altos niveles. En zonas del mundo susceptibles a este tipo de problemas, se pueden efectuar controles sobre las condiciones de recolección y del posterior transporte, y sobre el tratamiento

postcosecha (pasteurización, tratamiento de alta presión, congelación o radiación) durante los meses de verano cuando el riesgo es mayor (Lee *et al.*, 2010).

## 4. Microorganismos relacionados con los bivalvos

### 4.1 Coliformes

Los coliformes se caracterizan por ser bacilos anaerobios, Gram negativos que no forman esporas, definidos por su capacidad para fermentar la lactosa con producción de gas en menos de 48 h a 35°C. Sin embargo, esta definición incluye varias bacterias que no son necesariamente intestinales y por esta razón, otro grupo de coliforme, los coliformes fecales o termotolerantes, son importantes en las valoraciones de la calidad del agua (Madigan, 2015).

Los coliformes son un grupo de bacterias estrechamente relacionadas con el suelo (siembra), el agua y el tracto intestinal de los animales de sangre caliente, por lo que se han utilizado como indicadores de condiciones insalubres en la producción de alimentos y bebidas durante más de un siglo (3M, s.f.). Hoy en día, el recuento de coliformes es un indicador higiénico frecuente en varias industrias de alimentos y bebidas (Espinosa *et al.*, 2020).

La evaluación de los requisitos necesarios asociados con la calidad microbiológica del agua y los alimentos cosechados de esta es un aspecto fundamental. Por lo general, se mide por medio de los indicadores bacterianos de contaminación fecal como los coliformes y se relacionan con la posible presencia de microorganismos patógenos que pueden causar enfermedades por transmisión hídrica (González *et al.*, 2003).

El grupo “coliforme” incluye los siguientes géneros: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* y *Klebsiella*, en donde el coliforme más conocido es la *E. coli*, que es un residente común de los intestinos del humano y de los animales de sangre caliente, pero también, se puede encontrar en el entorno natural y transmitirse a las fuentes de agua potable (Espinosa *et al.*, 2020). Las bacterias coliformes son un grupo de 16 especies de bacterias que se utilizan para indicar la calidad del agua. Estas especies se dividen en tres grupos: coliformes totales, coliformes fecales o termotolerantes y *E. coli* (Culligan Nation, 2017).

Ya que los coliformes sirven como “organismos indicadores” y las pruebas de su presencia en general, en lugar de un género o especie individual pueden significar que existen condiciones antihigiénicas que pueden albergar organismos patógenos, si un área de muestra está bajo control, el número de estos organismos indicadores estaría contenido en cantidades relativamente pequeñas (3M, s.f.).

De acuerdo con González y Rubalcaba (2003), uno de los problemas sanitarios más críticos en los países de América Latina y el Caribe, es la descarga incontrolada de aguas residuales domésticas sin tratamiento, las cuales contaminan los recursos hídricos superficiales, subterráneos y las zonas costeras. Es por lo antes mencionado, que la inadecuada disposición de excretas y la ausencia o el deficiente sistema de alcantarillado y tratamiento están asociados a la contaminación del agua causando numerosas enfermedades, tales como el cólera, la amebiasis, la hepatitis, la fiebre tifoidea y paratifoidea, entre otras.

Algunas áreas de cultivo de moluscos bivalvos están expuestas a la contaminación de aguas residuales, lo que puede producir aumento de la concentración de bacterias conocidas como coliformes fecales o termotolerantes. La *E. coli* es la bacteria representativa de este grupo y cuando está en concentraciones altas, es la causa principal de enfermedades gastrointestinales al consumidor. Por lo que, es importante conocer la concentración de estas bacterias en los moluscos bivalvos antes de su consumo (Córdova, 2015).

Al ser los moluscos bivalvos, organismos que se alimentan por filtración, los bivalvos crudos o poco cocidos, han sido durante muchos años, reconocidos como un vector importante de muchos patógenos virales y bacterianos. Es por eso, que los microorganismos indicadores como los coliformes fecales o termotolerantes y *E. coli* se utilizan como índice de contaminación fecal y para clasificar las aguas de las que se cosechan los bivalvos (Jozić *et al.*, 2012).

En la mayoría de los casos la *E. coli* es inofensiva, pero algunas cepas pueden causar intoxicación alimentaria grave y enfermedades (3M, s.f.). En particular, algunos coliformes se han referido históricamente como coliformes fecales, pero desde entonces la investigación ha demostrado que la terminología más apropiada y actual, es la de coliformes termotolerantes debido a su tendencia a crecer y fermentar la

lactosa a una temperatura elevada. Por otro lado, las pruebas de coliformes termotolerantes se han utilizado para estimar el número de *E. coli* en una muestra, debido a que algunas *E. coli* patógenas (especialmente la *E. coli* O157:H7) no crecen bien a estas temperaturas elevadas (Espinosa *et al.*, 2020). Sin embargo, los coliformes termotolerantes y *E. coli* pueden usarse como un indicador de la presencia de contaminación fecal (FAO y WHO, 2000).

Debido a métodos simples para su aislamiento en bivalvos y una positiva correlación con otros patógenos, *E. coli* ha sido reconocido como una bacteria indicadora aceptable. La acumulación de *E. coli* y otras bacterias entéricas en los bivalvos es un proceso dinámico. Está relacionado con la tasa de filtración, el contenido bacteriano del agua ambiental y la eficiencia de filtración de las branquias. A pesar de que no hay consenso en la literatura sobre el proceso de filtración en bivalvos, muchos estudios han demostrado que es un proceso fisiológico regulado por muchos factores ecológicos, principalmente por temperatura, salinidad, tamaño de partícula y concentración. Como los bivalvos son organismos ectotérmicos, la temperatura ha sido reconocida como el mayor determinante de su estado fisiológico y su efecto separado sobre la acumulación de las bacterias entéricas en bivalvos se han evaluado en muchos estudios, sin embargo, los efectos interactivos de temperatura y otros factores, principalmente salinidad, en la acumulación de bacterias entéricas tienen poca investigación (Jozić *et al.*, 2012).

#### **4.1.1 Coliformes totales**

El término “coliformes totales” se refiere a un gran grupo de bacterias Gram negativas en forma de bastón que comparten varias características. El grupo incluye coliformes termotolerantes y bacterias de origen fecal, así como algunas bacterias que pueden aislarse de fuentes ambientales, por lo tanto, la presencia de coliformes totales puede o no indicar contaminación fecal. En casos extremos, un recuento alto para el grupo de coliformes totales puede estar asociado con un bajo o incluso, cero recuento para coliformes termotolerantes y tal resultado no necesariamente indicaría la presencia de contaminación fecal, ya que puede ser causado por la entrada de tierra o materia orgánica en el agua o por condiciones adecuadas para el crecimiento de otros tipos de

coliformes (Bartram y Ballance, 1996) son comunes en el ambiente (como en el suelo), en los intestinos de los animales y generalmente no son dañinas (Health, 2019).

Por lo tanto, “coliforme total” es un término general para las bacterias utilizadas en las pruebas de coliformes. La presencia de coliformes totales indica que su fuente de agua ha estado expuesta a la contaminación ambiental del suelo, plantas o animales. Es una señal de advertencia de que su suministro de agua está en riesgo de contaminación por otros patógenos que causan enfermedades (Culligan Nation, 2017). En el laboratorio, los coliformes totales se cultivan en un medio que contiene lactosa, a una temperatura de 35 a 37°C. Se identifican provisionalmente por la producción de ácido y gas a partir de la fermentación de la lactosa (Bartram y Ballance, 1996).

#### **4.1.2 Coliformes termotolerantes (fecales)**

Los coliformes fecales o termotolerantes son un subgrupo de coliformes totales. En términos generales, estas especies de bacterias coliformes se originan a partir de las heces de animales de sangre caliente, incluidos los humanos. Los coliformes termotolerantes pueden ingresar al agua a través de un sistema séptico defectuoso o agua de escorrentía contaminada por animales o agricultura. Los coliformes termotolerantes no necesariamente indican la presencia de patógenos nocivos, pero son un signo de alto riesgo (Culligan Nation, 2017).

Los coliformes fecales son actualmente conocidos como termotolerantes por su capacidad de soportar temperaturas más elevadas, ya que son un subgrupo de los coliformes totales, capaces de fermentar la lactosa a 44.5 °C. Esta denominación sería una forma más apropiada de definir este subgrupo que se diferencia de los coliformes totales por la característica de crecer a una temperatura superior (Díaz, 2003). Además, aproximadamente el 95% del grupo de los coliformes presentes en heces, están formados por *E. coli* y ciertas especies de *Klebsiella*. Ya que los coliformes termotolerantes se encuentran casi exclusivamente en las heces de animales de sangre caliente, se considera que reflejan mejor la presencia de contaminación fecal. Un aspecto importante es que la presencia de coliformes termotolerantes casi siempre indica contaminación fecal (Díaz, 2003) ya que, por lo general, más del 95% de los

coliformes termotolerantes aislados del agua provienen del intestino de animales de sangre caliente (Bartram y Ballance, 1996).

Los coliformes termotolerantes son un grupo particular que puede estar presente en el ambiente que rodea a los moluscos bivalvos. La utilización de estos microorganismos como indicadores de calidad microbiológica, ha sido una práctica establecida desde hace muchos años (Martínez y Villalobos, 2005).

#### **4.1.3 *Escherichia coli*.**

Científicamente conocida como *E. coli*, es una bacteria que se encuentra en los intestinos de las personas, de los animales, en el ambiente y a veces, también en los alimentos. La mayoría son inofensivas y son parte de un tracto intestinal sano. Sin embargo, algunas causan diarrea, infecciones urinarias, enfermedad respiratoria, infecciones sanguíneas y otras enfermedades (CDC, 2019). La *E. coli* es el indicador más fuerte de contaminación por enfermedades peligrosas transmitidas por el agua (Culligan Nation, 2017).

La *E. coli* reúne las condiciones del indicador ideal de contaminación fecal ya que está presente universalmente en las heces y en las aguas residuales, no puede crecer en las aguas naturales y es fácilmente detectable por métodos rápidos (Vázquez, 2013). Las cepas de *E. coli* productoras de toxina Shiga, pueden causar graves enfermedades a través de los alimentos, ya que la bacteria se transmite al hombre principalmente a través del consumo de alimentos contaminados, como productos cárnicos picados crudos o poco cocidos, leche cruda, hortalizas y semillas germinadas crudas contaminadas. Las toxinas Shiga reciben ese nombre por su semejanza con las toxinas producidas por *Shigella dysenteriae*. La *E. coli* O157:H7, es el serotipo de *E. coli* productora de toxina Shiga más importante por su impacto en la salud pública, ya que puede crecer a temperaturas que oscilan entre 7°C y 50°C, con una temperatura óptima de 37°C. Algunas pueden proliferar en alimentos ácidos, hasta a un pH de 4.4, y en alimentos con una actividad de agua (aW) mínima de 0.95 (OMS, 2018). Se ha establecido que cepas resistentes de *E. coli* pueden persistir por muchos meses o años en el ambiente (Martínez y Villalobos, 2005).

En la actualidad, se reconoce una sola especie en la cual hay varios cientos de tipos antigénicos, entre los que se destacan *E. coli* del tipo enteropatógena, la cual representa una variedad patógena que se presenta fundamentalmente en lactantes y niños pequeños ocasionando gastroenteritis aguda, producida por determinados serotipos pertenecientes a 17 grupos O. Su mecanismo de patogenicidad no está relacionado con la producción de toxinas termolábiles o toxinas termoestables; sin embargo, es capaz de producir una lesión intestinal y de destruir las microvellosidades intestinales (Martínez *et al.*, 2005).

Martínez y Villalobos (2005) y García (2000), indican que este fenómeno es conocido como “Attaching-Effacing” (adhesión y borrado), esta lesión se caracteriza por una íntima unión de las bacterias a los enterocitos (adhesión) y destrucción de sus microvellosidades (Borrado), el cual es mediado por una adhesina no fimbrial denominada intimina, una proteína de la membrana externa que media el estado final de adherencia, dando origen a modificaciones severas en la ultra estructura de las células epiteliales, con la producción de cuadros diarreicos que se manifiestan con la presencia de una diarrea acuosa que va desde simple a moderada, y puede ir acompañada con fiebre. Martínez y Villalobos (2005), también explican que la frecuencia y gravedad de las infecciones por *E. coli* enteropatógena han sido reportados desde 1960, en los países menos desarrollados y que del mismo modo, ha sido confirmada como el agente causal de la llamada diarrea de los viajeros en el Norte de África, México y Santiago de Chile.

En la actualidad, los brotes por este patógeno son esporádicos y por lo general, su incidencia se hace presente en aquellos países donde las prácticas de saneamiento son mínimas, y por ende, la contaminación a partir del consumo de agua y/o alimentos infectados directa o indirectamente (moscas o por las excretas de enfermos o portadores sanos), se ubican como los principales vehículos de transmisión de este patógeno (Martínez *et al.*, 2005).

## **4.2 Vibrio**

El género *Vibrio* es una de las poblaciones bacterianas más dominantes en los estuarios y ambientes marinos. Las bacterias que pertenecen al género *Vibrio* son

anaerobios facultativos, bacilos Gram negativos, asporógenas de forma recta o con una curvatura rígida, móviles por uno o más flagelos polares la mayoría tiene un flagelo polar único, cuando se cultiva en medio líquido. Por lo general, son oxidasa positiva. La mayoría produce oxidasa y catalasa, fermenta la glucosa sin producir gas, y generalmente, requieren iones de sodio para su crecimiento. Son sensibles al pH bajo, pero crecen bien a pH alto. En general, los *Vibrios* se pueden aislar fácilmente de las aguas costeras cuando la temperatura del agua es de alrededor de 15°C o más. Tres especies, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*, son patógenos humanos bien documentados. Las especies de *Vibrio* representan una proporción significativa de infecciones humanas por el consumo de mariscos crudos o poco cocidos (Kaysner y DePaola Jr., 2004; Nishibuchi y DePaola, 2005).

Existe cierta cantidad de especies de *Vibrio* que provocan enfermedades relacionadas con el consumo de moluscos. Las dos más importantes en términos de número de infecciones o mortalidad son *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*. La mayoría de estos *Vibrios* se encuentran de forma natural en medios costeros y estuarios, los que constituyen medios ideales para su desarrollo por su alta concentración de sal. La multiplicación del microorganismo aumenta a medida que la temperatura del agua se eleva, lo que explica, en parte, el aumento de casos en los meses templados (Dabanch *et al.*, 2009) y no todas están asociados a contaminación fecal, pero el tipo de *V. cholerae* O1/O139 que provoca el cólera epidémico está normalmente relacionado con contaminación fecal humana, aunque algunas cepas de estos tipos y de los que causan gastroenteritis no colérica (no-O1/no-O139), pueden estar de forma natural en el medio marino (Lee *et al.*, 2010).

De las especies de *Vibrio* que prevalecen en estuarios y ambientes marinos, siete especies pueden causar infecciones transmitidas por mariscos. Los serotipos de *V. cholerae* O1 y O139 producen toxina del cólera, y son agentes del cólera. Sin embargo, las infecciones de la ruta fecal-oral en el ambiente terrestre son responsables del cólera epidémico. Las cepas de *V. cholerae* que no son O1/O139 pueden causar gastroenteritis a través de la producción de toxinas conocidas o mecanismos desconocidos. Las cepas de *V. parahaemolyticus* capaces de producir hemolisina directa termoestable (TDH) y/o hemolisina relacionada con TDH (TRH) son la causa

más importante de gastroenteritis asociada con el consumo de mariscos. *V. vulnificus* es responsable de la septicemia primaria transmitida por mariscos y su infectividad depende principalmente de los factores de riesgo del huésped. La infección por *V. vulnificus* tiene la tasa de letalidad más alta (50%) de cualquier patógeno alimentario. La ecología y los métodos de detección, y control para todos los patógenos de *Vibrio* transmitidos por mariscos son esencialmente similares (Nishibuchi, 2005).

Los *Vibrios* en la naturaleza pueden estar en un estado inactivo o no ser capaces de crecer en los medios selectivos empleados (Colwell y Grimes 2000; Leyton y Riquelme, 2008). No obstante, se ha evidenciado que las bacterias en estado de viables no cultivables (VBNC) pueden también causar enfermedades, postulan que se observan diferencias entre las bacterias VBNC (Bacterias Viables no Cultivables) y las bacterias viables cultivables como reducción del tamaño de la célula, aumento del grosor de la pared celular, disminución de la cantidad de ARN, ADN y formación de biopelículas (Colwell y Grimes, 2000). Además, son el grupo mayormente cultivable de bacterias heterótrofas, especialmente de aguas costeras y la proporción de recuento total en placas varía de acuerdo con los métodos de muestreo, áreas geográficas, estacionalidad y medios de cultivos diferenciales. En el ecosistema marino los *Vibrios* juegan funciones importantes como biodegradación de la materia orgánica y regeneración de nutrientes, y además, pueden actuar como patógenos de organismos acuáticos de importancia comercial, o bien afectar al hombre (Leyton y Riquelme, 2008).

#### **4.2.1 *Vibrio cholerae***

Según la FDA (2012), estos organismos son bacterias Gram negativas, ligeramente curvadas, con forma de bastón que están naturalmente en ambientes acuáticos. Hay muchos serogrupos de *V. cholerae*, los cuales no causan cólera, pero puede causar diarrea, calambres estomacales, fiebre, náuseas y vómitos, que generalmente desaparecen por sí solos en aproximadamente una semana, pero que en personas con sistemas inmunes débiles, puede llegar a la sangre y causar infecciones graves o mortales, por ejemplos, personas con sistemas inmunes débiles como aquellas con VIH/SIDA o que toman medicamentos que disminuyen las acciones del sistema

inmunitario, como el caso de algunos tipos de medicamentos para la artritis reumatoide o el tratamiento del cáncer. Estas personas, especialmente, siempre deben cocinar bien sus mariscos y deben consultar a un profesional de la salud si desarrollan síntomas. Este tipo de *Vibrio* generalmente vive en aguas ligeramente saladas, pero también puede vivir en el océano y en las aguas continentales frescas, como los ríos. También, puede penetrar en el agua desde los desechos intestinales de las personas infectadas (por ejemplo, desde las aguas residuales) (Quiñones *et al.*, 2000; Kaysner y DePaola, 2004; CDC, s.f; Lee *et al.*, 2010;).

El agua contaminada con *Vibrio* puede causar enfermedades si las personas beben el agua o comen mariscos que han estado viviendo en ella, o si el agua contaminada entra en contacto con los alimentos de otras maneras (FDA, 2012; WHO, 2012). Pero solo dos serogrupos, el O1 y el O139 son los únicos agentes causantes del cólera, que es una enfermedad transmitida por el agua y los alimentos con potencial epidémico y pandémico (WHO, 2019). La virulencia de los serogrupos O1 y O139 de *V. cholerae* se debe a la producción de una enterotoxina llamada toxina del cólera (CT) y el pilus co-regulado de la toxina (TCP) (Kaper, 1995; Kaysner y DePaola, 2004; FDA, 2012). Este tipo de *Vibrio* puede vivir tanto en agua salada (agua del océano costero) como en agua dulce (ríos). Crece allí de forma natural o puede penetrar en el agua a través de los desechos intestinales de las personas infectadas (aguas residuales). *V. cholerae* O1 y O139 está entre los más resistentes patógenos del género *Vibrio sp.* y tienen la capacidad de sobrevivir en agua dulce y en agua compuesta de hasta ~ 3% de sal. Sin embargo, estos organismos son muy susceptibles a los desinfectantes, las bajas temperaturas (especialmente la congelación) y los ambientes ácidos. Se inactivan fácilmente a temperaturas > 45°C, y cocinar los alimentos es letal para *V. cholerae* O1 y O139. El *V. cholerae* O139, es único entre las cepas de *V. cholerae*, ya que está encapsulado. Sin embargo, esto no parece proporcionar mayor patogenicidad o resistencia a los desinfectantes comunes, como el etanol y el blanqueador (FDA, 2012).

Mediante estudios en personas voluntarias saludables, se ha demostrado que la dosis infectiva necesaria para provocar la enfermedad es aproximadamente de un millón de células y se ha concluido que, una vez adquirido el cólera, la administración de

tetraciclina, así como de antiácidos, mejora rápidamente el curso de la enfermedad (Kaysner y DePaola, 2017).

#### **4.2.2 *Vibrio parahaemolyticus***

El *V. parahaemolyticus* es una bacteria halófila, Gram negativa, bacilo de forma curva que se distribuye ampliamente en los ambientes marinos costeros. Tanto las formas patógenas como no patógenas del organismo pueden aislarse de estuarios, ambientes marinos y de los mariscos recolectados en estos ambientes. (Hernández *et al.*, 2005). Está relacionado frecuentemente con una variedad de productos del mar crudos como muchas especies de pescados, mariscos y crustáceos (Su y Liu, 2007; Dabanch *et al.*, 2009). El consumo de mariscos crudos o poco cocidos contaminados con *V. parahaemolyticus* puede conducir al desarrollo de gastroenteritis aguda caracterizada por diarrea, dolor de cabeza, vómitos, náuseas y calambres abdominales (Su y Liu, 2007).

Las temperaturas óptimas para *V. parahaemolyticus* son de 20°C a 35°C y puede crecer a temperaturas de hasta 41°C. Se inactiva lentamente a temperaturas <10 °C (temperatura mínima de crecimiento) y los cultivos nunca deben almacenarse en refrigeradores y se lisa casi inmediatamente en agua dulce, por lo tanto, no suele transmitirse por vía fecal-oral. Como otros Vibrios, *V. parahaemolyticus* es muy susceptible a pH bajo, congelación y cocción (FDA, 2012).

Dos hemolisinas de *V. parahaemolyticus*, la hemolisina termoestable directa (TDH) y la hemolisina relacionada con TDH (TRH) son importantes factores de virulencia. La TDH es el factor de virulencia más importante producida por aproximadamente 95% de las cepas y responsable de la producción de diarrea (Dabanch *et al.*, 2009).

Aunque la enfermedad generalmente es leve o moderada, *V. parahaemolyticus* también puede causar septicemia en personas susceptibles. Aquellos en riesgo incluyen a las personas con diabetes, enfermedad hepática, enfermedad renal, cáncer, SIDA u otras enfermedades que resultan en un estado inmunocomprometido, y los que reciben medicamentos inmunosupresores (Kaysner y DePaola., 2004; FDA, 2012).

Entre las características fenotípicas que permiten su identificación, destaca su incapacidad de metabolizar la lactosa y una reacción de oxidasa positiva. El sistema

de serotipificación de *V. parahaemolyticus* incluye 13 diferentes antígenos O y 71 diferentes tipos K, siendo el O3:K6 el principal responsable de los grandes brotes y epidemias (Dabanch *et al.*, 2009).

#### **4.2.3 *Vibrio vulnificus***

Son bacilos Gram negativos, se encuentra en estuarios y está asociado con varias especies marinas, como plancton, mariscos, crustáceos y peces (FDA, 2012) y es fenotípicamente similar a *V. parahaemolyticus*. Esta bacteria causa enfermedades transmitidas por alimentos y en heridas, cualquiera de estas puede progresar rápidamente hasta una septicemia mortal. Causa tres cuadros clínicos en humanos: septicemia, gastroenteritis e infección en heridas (Jones, 2009). Los responsables de que el número de *V. vulnificus* en los productos de la pesca se incrementen en un momento dado son la temperatura, el pH, la salinidad y el incremento de la materia orgánica, entre otras (Mecalco *et al.*, 2005).

Las temperaturas óptimas para *V. vulnificus* están entre 20°C a 35°C y puede crecer a temperaturas de hasta 41°C. Se inactiva lentamente a temperaturas <10°C (temperatura mínima de crecimiento) y los cultivos nunca deben almacenarse en refrigeradores. *V. vulnificus* es halófilo; se lisa casi inmediatamente en agua dulce; por lo tanto, generalmente no se transmite por vía fecal-oral. Se requiere al menos 0.5% de NaCl en todos los medios y 2% de NaCl es óptimo (FDA, 2012).

Los moluscos bivalvos crudos son la principal fuente de transmisión alimentaria del *V. vulnificus* (Kaysner y Paola, 2017), pero también se puede contraer este tipo de infección a través de una herida abierta. Esto puede suceder cuando una herida entra en contacto con pescados y mariscos crudos o poco cocidos, sus jugos o salpicaduras, o con el agua salada (CDC, 2019).

## OBJETIVOS

### General

- Evaluar la calidad microbiológica de tres zonas de producción de bivalvos mediante indicadores de contaminación fecal.
- Determinar la presencia de *V. cholerae*, *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus* en bivalvos de tres zonas de producción en Panamá.

### Específicos

- Evaluar la calidad microbiológica de las zonas de producción de bivalvos utilizando coliformes totales, coliformes termotolerantes y *E. coli* como indicadores de contaminación fecal a través de la técnica del Número Más Probable (NMP).
- Establecer la categoría microbiológica de las tres zonas de producción de bivalvos según normas de la Comunidad Europea.
- Aislar e Identificar *V. cholerae*, *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus* en cada muestra colectada de las zonas de producción.

# **CAPÍTULO II**

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

## 2.1 MATERIALES

### 2.1 MATERIALES

**2.1.1 Equipos de laboratorio:** máquina de hielo ICE-O-MATIC (Modelo CF450A38P, Estados Unidos), Autoclave Yamato (SM200, Japón), Licuadora SANKEY (Modelo BL-1576C, China), Incubadora LAB-LINE (120, Estados Unidos); Thermolyne (142300, Estados Unidos), Refrigeradora BIO SAMSUNG (Modelo SR-38NMB, ); Agitador con Baño María Precision Scientific (66800, Estados Unidos), Lámpara de luz UV (Modelo EA-160, Estados Unidos), Destilador AUTOSTILL 5 (SplitStream Wheaton, ), Balanza analítica Denver (Modelo 4101, ), Balanza analítica METTLER (AE200, Suiza), Balanza semi – analítica METTLER (P163, Suiza), Cámara de flujo laminar LABCONCO (Modelo NSF, Estados Unidos), Micropipetas Finnpiette Digital 40-200  $\mu\text{L}$  (Estados Unidos), Micropipetas Eppendorf 1000  $\mu\text{L}$  (Estados Unidos), Puntas OXFORD size 1-200  $\mu\text{L}$ , 201-1000  $\mu\text{L}$  ( ), Asa bacteriológica ( ).

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

**2.1.3 Medios de cultivos y Reactivos:** NaCl (AMRESCO, Estados Unidos);  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (J.T. Baker, Estados Unidos); NaOH,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (J.T. Baker, Estados Unidos); peptona (Bacto™ Peptone, Estados Unidos); caldo lauril sulfato, caldo EC-MUG (Criterion, Estados Unidos); agar TCBS (Difco™, Estados Unidos y Francia); agar nutritivo (CONDA, España); caldo nutritivo (Scharlay, España) y agar Hardy-Chrome Vibrio.

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

## 2.2 METODOLOGÍA

### 2.2.1 Sitios de Muestreo

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

**Tabla 5** Ubicación de las Zonas de muestreo.

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

**Zona 1:** Se encuentra en la provincia de Panamá Oeste, distrito de Arraiján a unos 30 Km de la Ciudad de Panamá, en la Bahía de Panamá. La zona está caracterizada por un litoral areno-fangoso, el área posee una pendiente ligera con una separación de las líneas de bajamar y pleamar de aproximadamente 1 Km y más. Sus orillas están pobladas por mangles de las especies *Rhizophora mangle* y *Avicennia nítida* (Smithsonian, 2013).

**Zona 2:** Se encuentra ubicado en la parte occidental de la provincia de Panamá Oeste, distrito de Chame en la cordillera central en la vertiente del Pacífico, a unos 65 km de la ciudad de Panamá (Ecu Red, 2010).

**Zona 3:** Se encuentra en la provincia de Panamá, distrito de Chepo, es el puerto más importante del este de Panamá y está a solo 40 min desde Tocumen. Este se localiza en la desembocadura del río Bayano, aguas abajo de la represa. El mismo es utilizado por las personas para trasladarse hacia las comunidades de El Llano, Santa Cruz de

Chinina, Chimán, Brujas, Chepillo y el Archipiélago de las Perlas. La travesía se realiza en las pintorescas piraguas. El puerto de Coquira constituye un importante punto de comercio de pescado y mariscos para los Chepanos y capitalinos que se trasladan hasta este lugar con la finalidad de conseguir moluscos para su consumo y comercialización en la Ciudad de Panamá y en el extranjero (Guerrero, 2010).

### **2.2.2 Diseño experimental**

El muestreo se realizó en las tres zonas de producción durante los 3 meses de la estación seca (febrero, marzo y abril). En cada mes, se realizó 1 muestreo del cual se obtuvo 5 muestras procedentes de cada una de las 3 zonas de producción. Estas muestras fueron transportadas en cadena de frío y procesadas de inmediato en los laboratorios de Microbiología Experimental y Aplicada (LAMEXA) y Microbiología de Aguas (LAMA).

El traslado de la muestra al laboratorio, la preparación de la muestra y análisis de la muestra para *Vibrio*, coliformes y *E. coli*, se realizó siguiendo los protocolos descritos en Food Microbiology Laboratory (Contemporary Food Science, 2004, p. 67-72) para el análisis de *Vibrio*, y los descritos en el Canadian Shellfish Sanitation Program (2010, App I p. 6-7) para el análisis de coliformes y *E. coli*, con modificaciones en el diseño de análisis de la muestra, esto con la intención de ajustar los volúmenes que deseamos manejar.

### **2.2.3 Procesamiento de la muestra**

Los bivalvos pasaron previamente por una revisión física para eliminar las unidades defectuosas que no estén herméticamente cerradas, luego fueron lavadas con agua limpia utilizando la ayuda de un cepillo para eliminar fango e impurezas. Los bivalvos fueron abiertos dentro de la cámara de flujo laminar donde se extrajo la carne y el líquido intervalvar hasta que se obtuvo 100 g de muestra. Se trabajó con 5 muestras de 100 g cada una a las cuales se les agregó 100 mL de Buffer Fosfato Peptona 0.5%, previamente esterilizado. Estas muestras fueron homogeneizadas empleando una licuadora comercial.

Para el análisis de coliformes, se pesó 10 g de cada muestra luego se añadió 90 mL de buffer Fosfato Peptona 0.5% previamente esterilizado y de esta manera, se obtuvo la dilución  $10^{-1}$ , y seguido, se realizó una dilución seriada hasta  $10^{-3}$ . Para el análisis de Vibrio, de cada muestra se pesó 5 g y se le añadió 45 mL de solución NaCl 2% que fue la primera dilución de  $10^{-1}$ .

## **2.2.4 Análisis Microbiológico**

### **2.2.4.1 Prueba Presuntiva – Coliformes Totales**

A las 3 diluciones de las 5 muestras obtenidas previamente en la preparación de la muestra se le realizó la técnica de tubos múltiples utilizando alícuotas de 10 mL que se colocaron en tubos que contenían 10 mL de caldo lauril sulfato doble y tubos Durham. Se realizó el mismo procedimiento con alícuotas de 1 mL y 0.1 mL. Estos tubos fueron incubados en un periodo de 24- 48 h a 37°C. La presencia de una burbuja en el tubo Durham nos indicó la presencia de gas y nos confirmó que el tubo es positivo.

### **2.2.4.2 Prueba Confirmativa**

#### **Coliforme termotolerantes**

Los tubos positivos de la prueba presuntiva (producción de gas) se inocularon mediante azadas en tubos que contenían EC-MUG y tubos Durham. Estos tubos se incubaron a una temperatura de 44°C durante un periodo de 24 a 48 h. La turbidez y la presencia de gas nos indicó la presencia de coliformes termotolerantes.

### **2.2.4.3 *E. coli***

Los tubos que salieron positivos para coliformes termotolerantes fueron expuestos a una lámpara UV donde se pudo observar fluorescencia y así, se pudo determinar presencia de *E. coli*. Usando la combinación de tubos fluorescentes positivos en cada dilución, se determinó el NMP/100 g de *E. coli* de la tabla obtenida en Bacteriological Analytical Manual (BAM, 2020) apéndice 2.

#### 2.2.4.4 Vibrios – Prueba Presuntiva

De la primera dilución obtenida previamente en la preparación de las 5 muestras, se realizó una dilución seriada hasta  $10^{-5}$  en tubos con solución NaCl 2%. Las diluciones  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  de cada muestra se inocularon en tubos con APW (Alkaline Peptone Water/ Agua peptonada alcalina) mediante una dilución seriada y la técnica de tubos múltiples. Estos fueron incubados a 37°C durante un periodo de 24 a 48 h. Los tubos positivos de APW se inocularon en platos Petri que contenían TCBS y se incubaron a 37°C durante 24 a 48 h. De los platos que se obtuvieron crecimiento de colonias verdes o amarillas, se aisló una colonia y se sembró en tubos que contenían caldo nutritivo con NaCl 2%. Estos fueron incubados a 37°C durante 24 a 48 h (McLandsborough, 2004).

Los tubos positivos fueron pasados a platos Petri con Agar Nutritivo con NaCl 2% fueron incubados a 37°C durante 24-48 h. Aquellos en donde hubo crecimiento se les realizó la prueba de oxidasa para confirmar la presencia de Vibrios información obtenida de Bacteriological Analytical Manual (BAM, 2004).

Posteriormente, los cultivos positivos eran sembrados en agar Hardy Chrom - Vibrio un medio para el aislamiento y la diferenciación selectiva de las especies de Vibrio en función de los colores de las UFC, debido a las actividades enzimáticas  $\beta$ -galactosidasa y  $\beta$ -glucosidasa. Observándose el crecimiento de unidades formadoras de colonias (UFC) de color turquesa indicando *V. parahaemolyticus*, los platos Petri que presentaban crecimiento de UFC de color violetas se les aplicó la luz UV para así poder diferenciar si eran *V. cholerae* o *Vi. vulnificus*

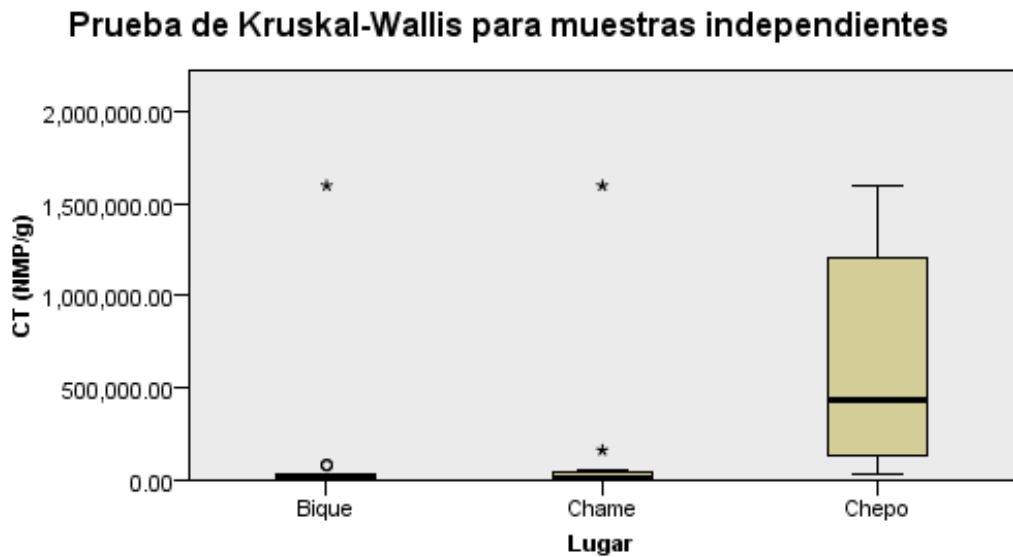
# **CAPÍTULO III**

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### 3.1 RESULTADOS

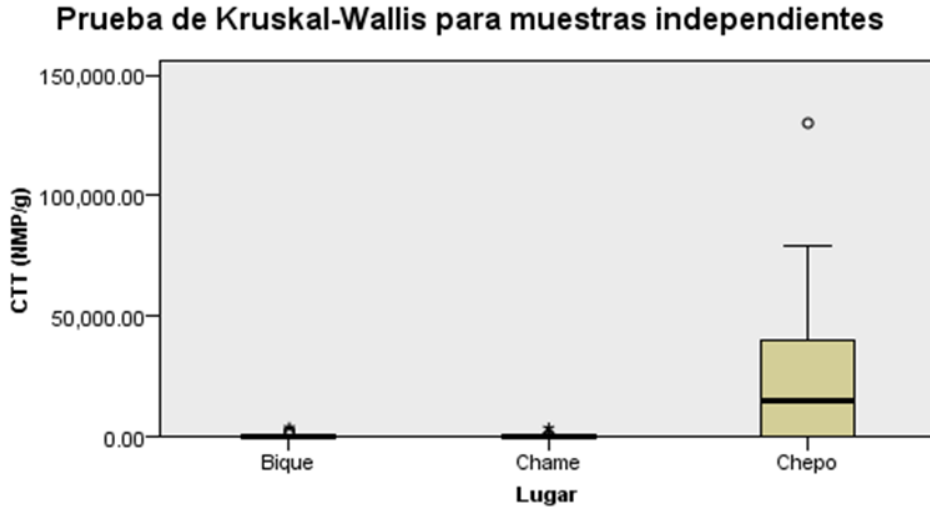
#### 3.1.1 Distribución de coliformes y *E. coli* en zonas de producción

Se determinó la presencia de tres parámetros microbiológicos en muestras de almejas de tres zonas de producción. El primer parámetro fue el de coliformes totales, que presentó valores de  $6.4 \times 10^3$  NMP/100g *Anadara* sp. (El Espavé),  $1.8 \times 10^3$  NMP/100g *Leukoma* sp. (Playa Bique), y  $3.9 \times 10^5$  NMP/100g *Donax* sp. (Chinina), respectivamente. Al comparar las medias geométricas obtenidas por zona de producción para este parámetro, se observó que hay diferencias significativas entre los diferentes sitios de muestreo ( $p=0.000$ ) (Figura 12; Cuadro5).



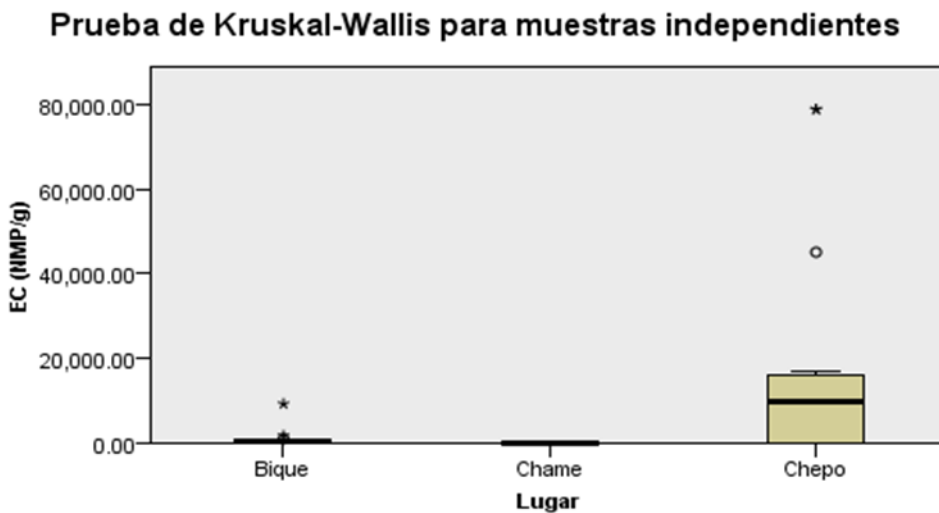
**Figura. 1.** Distribución de coliformes totales según las zonas de producción.

El siguiente parámetro determinado fue del indicador coliformes termotolerantes, y presentó valores de 188.4 NMP/100 g *Anadara* sp. (El Espavé), 200.7 NMP/100g NMP/100 g *Leukoma* sp. (Playa Bique) y  $2.1 \times 10^4$  NMP/100 g *Donax* sp. (Chinina), respectivamente. De acuerdo con este parámetro, los sitios de producción de El Espavé y Playa Bique están la categoría A y Chinina se encuentra en la categoría B. Al comparar las medias geométricas obtenidas por zona de producción para este parámetro, se observó que hay diferencias significativas entre los diferentes sitios de muestreo ( $p=0.004$ ) (Figura 13; Cuadro5).



**Figura. 2.** Distribución de coliformes termotolerantes según las zonas de producción.

El parámetro para el indicador *E. coli* presentó valores de 186.9 NMP/100 g *Leukoma* sp. (Playa Bique),  $1.1 \times 10^3$  NMP/100 g *Donax* sp. (Chinina), y 70.7 NMP/100 g *Anadara* sp. (El Espavé), respectivamente. De acuerdo con este parámetro los sitios de producción de El Espavé y Bique pertenecen a la categoría A y Chinina pertenecen a la categoría C. Al comparar las medias geométricas obtenidas por zona de producción para este parámetro, se observó que hay diferencias significativas entre los diferentes sitios de muestreo ( $p = 0.010$ ). (Figura 14, Cuadro 5).



**Figura. 3** Distribución de *E. coli* según las zonas de producción.

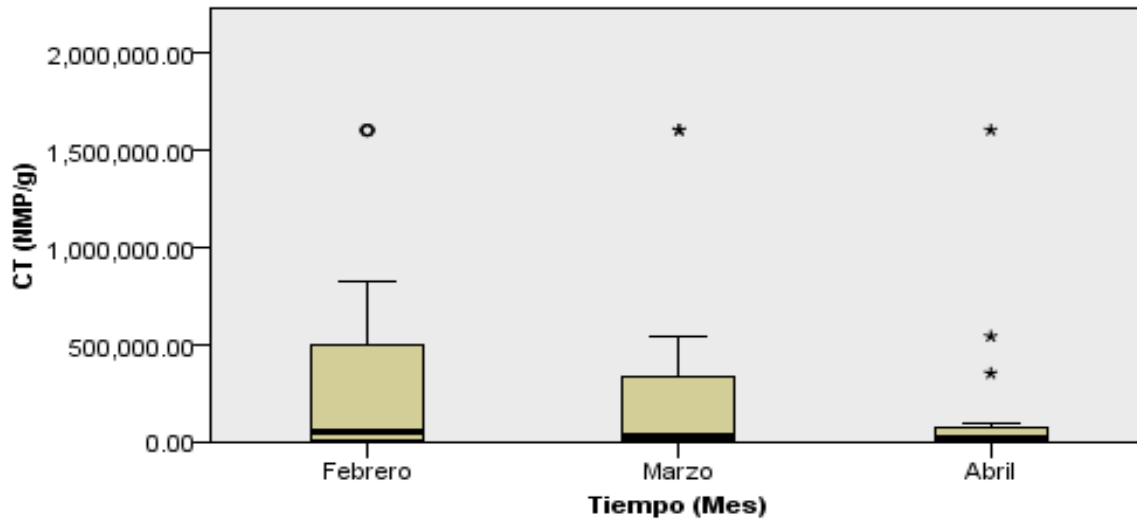
**Tabla 6** Categoría de la Zona de Producción Según Indicadores Microbiológicos de contaminación fecal

INDICADORES MICROBIOLÓGICOS	CATEGORÍAS DE LA NORMA TÉCNICA DE LA UNIÓN EUROPEA (NMP/100 g)			MEDIAS GEOMÉTRICAS DE LA DENSIDAD DE INDICADORES MICROBIOLÓGICOS POR GENERO DE BIVALVO (NMP / 100 g)			VALOR DE p
	A	B	C	El Espavé <i>Anadara</i> sp.	Playa Bique <i>Leukoma</i> sp.	Chinina <i>Donax</i> sp.	
Coliformes totales	-	-	-	$6.4 \times 10^3$	$1.8 \times 10^3$	$3.9 \times 10^5$	0.000
Coliformes termotolerantes	$\leq 300$	$\leq 6000$	$\leq 60000$	188.4	200.7	$2.1 \times 10^4$	0.004
Escherichia coli	$\leq 230$	$\leq 4600$	$\leq 46000$	70.7	186.9	$1.1 \times 10^4$	0.010
ZONA DE PRODUCCIÓN				El Espavé	Playa Bique	Chinina	
CATEGORÍA DE LA ZONA DE PRODUCCIÓN				A/A	A/A	B/C	

El comportamiento de los coliformes termotolerantes ubican a El Espavé y Playa Bique en la categoría A y a Chinina en categoría B. En el caso de E. coli los resultados obtenidos posicionan a El Espavé y Playa Bique categoría A mientras que a Chinina en categoría C.

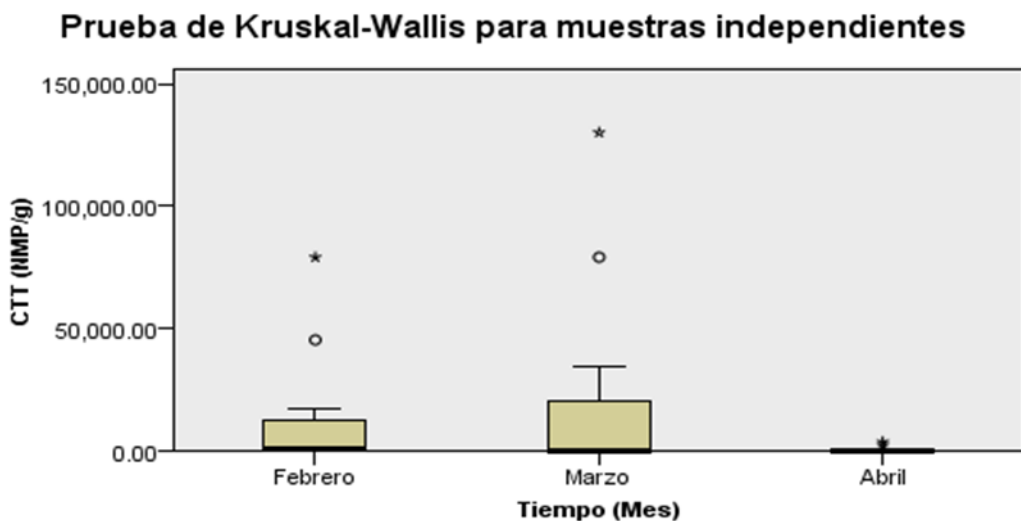
### 3.1.2 Distribución de Coliformes y *E. coli* según los meses de muestreo

El comportamiento de los coliformes totales durante los meses de muestreo fue el siguiente:  $2.1 \times 10^5$  NMP/100 g (febrero),  $1.5 \times 10^5$  NMP/100 g (marzo) y  $4.8 \times 10^5$  NMP/100 g (abril), respectivamente. En este caso, al comparar las medias geométricas obtenidas para cada mes, se observó que había diferencias significativas ( $p = 0.542$ ) (Figura15; Cuadro 6).



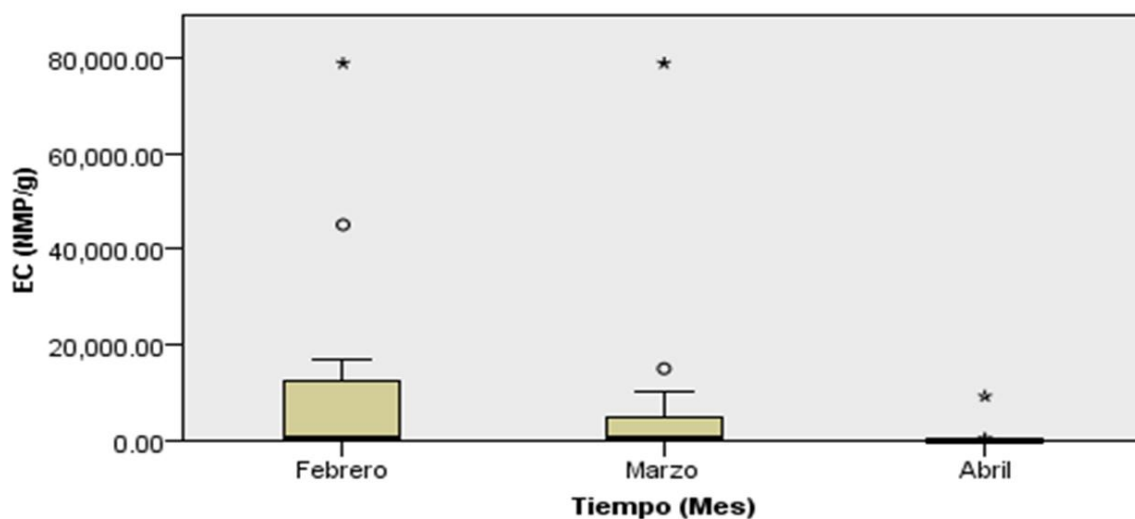
**Figura. 4** Distribución de coliformes totales según los meses de muestreo.

En el caso de coliformes termotolerantes en los diferentes meses de muestreo fue de la siguiente manera:  $8.4 \times 10^3$  NMP/100 g (febrero),  $1.3 \times 10^4$  NMP/100 g (marzo) y 62.3 NMP/100 g (abril), respectivamente. Estos resultados colocan a los meses de febrero y marzo en la categoría C y al mes de abril en la categoría A. Sin embargo, al comparar las medias geométricas de cada mes de muestreo, se observó que no hay diferencias significativas en la carga microbiana ( $p = 0.000$ ). (Figura 16; Cuadro 6).



**Figura. 5** Distribución de coliformes termotolerantes según los meses de muestreo.

Para *E. coli*, el comportamiento durante los meses de muestreo fue el siguiente:  $8.3 \times 10^3$  NMP/100 g (febrero),  $3.8 \times 10^3$  NMP/100 g (marzo) y 51.1 NMP/100 g (abril), respectivamente. Estos resultados colocan a los meses de febrero en la categoría A, marzo categoría B y abril en la categoría A. Al comparar las medias geométricas obtenidas para cada mes, se observó que hay diferencias significativas ( $p = 0.000$ ) (Figura 17; Cuadro 6).



**Figura. 6** Distribución de *E. coli* según los meses de muestreo.

**Tabla 7** Resultado de NMP de Coliformes y *E. coli* en las muestras de Bivalvos durante los meses de muestreo.

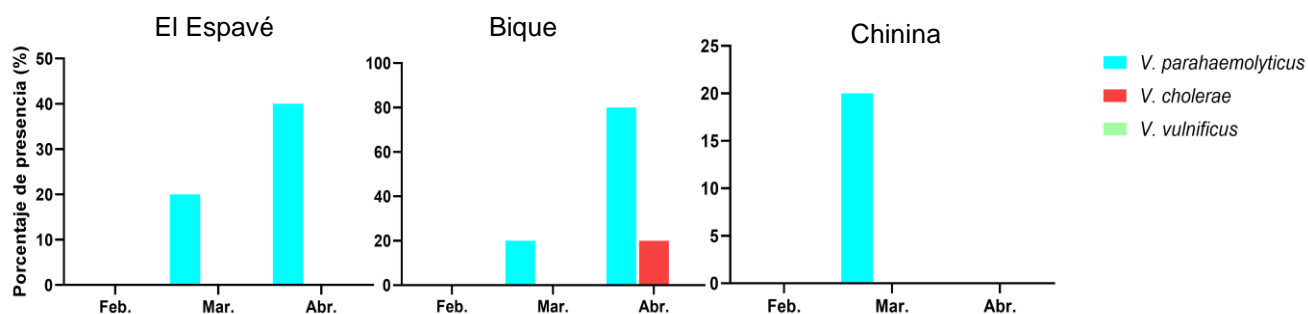
INDICADORES MICROBIOLÓGICOS	CATEGORÍAS DE LA NORMA TÉCNICA DE LA UNIÓN EUROPEA (NMP/100 g)			MEDIAS GEOMÉTRICAS DE LA DENSIDAD DE INDICADORES MICROBIOLÓGICOS POR MES DE COLECTA (NMP / 100 g)			VALOR DE p
	A	B	C	Febrero	Marzo	Abril	
Coliformes totales	-	-	-	$2.1 \times 10^5$	$1.5 \times 10^5$	$4.8 \times 10^5$	0.542
Coliformes termotolerantes	$\leq 300$	$\leq 6000$	$\leq 60000$	$8.4 \times 10^3$	$1.3 \times 10^4$	62.3	0.000
Escherichia coli	$\leq 230$	$\leq 4600$	$\leq 46000$	$8.3 \times 10^3$	$3.8 \times 10^3$	51.1	0.000
CATEGORÍA DE LA FECHA DE COLECTA				C/C	C/B	A/A	

### 3.1.3 Distribución de Vibrios de acuerdo con las zonas de producción

Se analizaron 45 muestras de Bivalvos donde se determinó la presencia de *V. parahaemolyticus* en un 20% en la especie *Anadara* sp. (Espavé) para el mes de marzo y 40% para el mes de abril. Para la especie de *Leukoma* sp. (Bique) para el mes de marzo se determinó en un 20% esta bacteria, para el mes de abril hubo un aumento del aumento de esta bacteria con un 80%. En el caso de la especie *Donax* sp. (Chinina) en el mes de marzo se determinó en un 20%. Solamente se determinó la presencia de *V. cholerae* en la especie *Leukoma* sp. (Bique) para el mes de abril en un 20% de la muestra.

**Tabla 8** Porcentaje de muestras positivas de Vibrios (*V. cholerae*, *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus*) en tres zonas de producción de bivalvos en la estación seca de 2021.

Sitio de Muestreo	<i>V. parahaemolyticus</i>			<i>V. cholerae</i>			<i>V. vulnificus</i>		
	Febrero	Marzo	Abril	Febrero	Marzo	Abril	Febrero	Marzo	Abril
El Espavé, Chame	0	20%	40%	0	0	0	0	0	0
Bique, Arraiján	0	20%	80%	0	0	20%	0	0	0
Chinina, Chepo	0	20%	0	0	0	0	0	0	0



**Figura. 7** Porcentaje de Vibrio sp. en Zonas de extracción durante los meses de muestreo.

## 3.2 DISCUSIÓN

### 3.2.1 Calidad microbiológica de 3 zonas de producción de moluscos bivalvos mediante indicadores de contaminación fecal.

Con el objetivo de evaluar la calidad sanitaria se midieron los indicadores de contaminación fecal en tres zonas de producción de moluscos bivalvos de importancia comercial en Panamá: El Espavé, Provincia de Panamá Oeste, distrito de Chame, Playa de Bique, provincia de Panamá Oeste, distrito de Arraiján, y Playa de Chinina, provincia de Panamá, distrito de Chepo.

Los valores promedio obtenidos de las zonas de producción para coliformes totales, estuvieron en un rango entre  $6.4 \times 10^3$  NMP/100 g (El Espavé) y  $1.8 \times 10^3$  NMP/100 g (Cuadro 5) en donde la menor concentración de coliformes totales pertenece a las muestras de *Leukoma* sp. (Playa Bique) y la mayor concentración observada fue en las muestras de *Anadara* sp. (El Espavé). Según el Códex Alimentarius, los coliformes totales están relacionados a una variedad de fuentes ambientales, mas no necesariamente de origen fecal, por lo que, para efecto de evaluar la calidad microbiológica mediante indicadores de contaminación fecal, el estudio se limita principalmente al uso de *E. coli* o coliformes termotolerantes (fecales) (Lee *et al.*, 2010).

Los valores promedio obtenidos para el parámetro de coliformes termotolerantes (fecales) se reportaron en un rango entre 188.4 NMP/100 g y  $2.1 \times 10^4$  NMP/100 g (Cuadro 5) donde la zona de producción de El Espavé presentó la menor concentración y Chinina por su parte, la mayor concentración. Los coliformes termotolerantes (fecales) son un grupo particular que puede estar presente en el ambiente que rodea a los moluscos bivalvos y pueden ingresar al agua a través de un sistema séptico defectuoso o agua de escorrentía contaminada por animales o agricultura, más no necesariamente indican la presencia de patógenos nocivos, sin embargo, son un signo de alto riesgo (Culligan Nation, 2017; Ratna, 2018), ya que se encuentran casi exclusivamente en las heces de animales de sangre caliente, incluidos los humanos, por lo que se considera que casi siempre indican contaminación fecal (Díaz, 2003; Cisneros , 2011).

Para el parámetro de *E. coli*, los valores promedios estuvieron entre 70.7 NMP/100 g y  $1.1 \times 10^3$  NMP/100 g (Cuadro 5) siendo la zona de producción de El Espavé la que presentó menor concentración de *E. coli* mientras que Chinina presentó la mayor concentración de este indicador. *E. coli* reúne las condiciones del indicador ideal de contaminación fecal debido a que está presente universalmente en las heces y en las aguas residuales, pero no puede crecer en las aguas naturales y es fácilmente detectable por métodos rápidos (Vázquez, 2013; Khan y Gupta, 2020).

Los resultados obtenidos revelan que la calidad microbiológica de las muestras colectadas en las zonas de producción de El Espavé y Playa Bique cumplen con los parámetros mínimos necesarios para su consumo directo, ya que los niveles de *E. coli* presentes en las mismas, estuvieron por debajo del mínimo permitido ( $\leq 230$  NMP *E. coli* /100 g de carne y líquido intervalvar) de acuerdo a los criterios para la clasificación de zonas de producción de moluscos en la Unión Europea presentado en el Manual de Buenas Prácticas para el cultivo de moluscos bivalvos (Cuadro 4). Por otro lado, las muestras colectadas de la zona de producción de Chinina si requieren de un tratamiento previo a su consumo. Algunas áreas de cultivo de moluscos bivalvos están expuestas a la contaminación de aguas residuales, lo que puede producir dentro de los bivalvos una alta o baja concentración de coliformes termotolerantes (fecales), en donde *E. coli* es la bacteria representativa de este grupo y cuando está presente en concentraciones altas, es la causa principal de enfermedades gastrointestinales al consumidor (Córdova, 2015, Kittana *et al.*, 2018).

### **3.2.2 Categorización de las tres zonas de producción de bivalvos.**

En relación a la categorización de las zonas de producción, al igual que nosotros, estudios anteriores (Saldaña *et al.*, 2006; Gómez *et al.*, 2016; Garrido *et al.*, 2018) han utilizado los indicadores de contaminación fecal para categorizar las zonas de producción de producción de El Espavé, Playa Bique y Chinina (cuadro 8). Al compararse se puede observar que los resultados obtenidos en este estudio muestran que la zona de producción de El Espavé mantuvo su categoría A y calidad microbiológica, Playa Bique mejoro su categorización al posicionarse en categoría A, señalando que los niveles de indicadores de contaminación fecal fueron menores

durante esta estación seca en comparación a años anteriores. Por otro lado, Chinina descendió a categoría C, esto indica una desmejora en la calidad microbiológica, por consiguiente, sugiere que los moluscos de esta zona pudieran estar siendo cosechados en aguas que presentan un posible incremento de contaminación fecal.

**Tabla 9** Cuadro comparativo de categorización de 3 zonas de producción importancia comercial en Panamá.

Año	Categoría		
	El Espave	Playa Bique	Chinina
2006	A	B	B
2016	A	B	B
2018	A	C	B
2021	A	A	C

### **El Espavé**

El Espavé, en la provincia de Panamá Oeste, distrito de Chame, presentó los valores más bajos en cuanto a los indicadores de contaminación fecal, esto puede deberse a que las masas de aguas de la Bahía de Chame están en constante renovación, donde el aporte de las aguas continentales en esta estación, modifica la parte interna de la misma, originando un desplazamiento hacia afuera (Araúz, 1995) y provocando que las corrientes marinas de esta área eviten que las posibles descargas de aguas residuales, afecten la mayor parte del tiempo a estas zonas (Villalobos, 1997).

### **Bique**

La zona de producción de Bique, ubicada en la provincia de Panamá Oeste, distrito de Arraiján, presento valores bajos de indicadores de contaminación fecal siendo ubicado en categoría A mejorando así su categorización y calidad sanitaria de sus moluscos bivalvos ya que en estudios previos estuvo en categoría B y C (cuadro 8). En el año 2018 fue ubicado en categoría C, esto puede deberse a que dicho estudio fue realizado durante los meses de marea baja en estación lluviosa ( agosto, septiembre y octubre), considerando la contribución del suelo y sedimento adyacente al área de crecimiento

de moluscos bivalvos, como reservorio de bacterias coliformes durante los periodos de precipitación, que traen como consecuencia escorrentías que arrastran desechos domésticos y agrícolas a las costas (Muñoz *et al.*, 2008), lo cual sucede en forma tenue durante la estación seca (diciembre-abril) (Garrido *et al.*, 2018).

### **Chinina**

En cuanto a la zona de Chinina, ubicada en el distrito de Chepo, según los datos obtenidos de *E. coli*, se ubicó en la categoría C. Esta zona de producción presento los valores más altos de indicadores de contaminación fecal. Esto pudiera señalar que esta zona está viéndose afectada por las aguas residuales provenientes de las poblaciones aledañas. Según la estimación del Censo de Población de 2020, la población registrada para el distrito de Chepo fue de 60345 habitantes, frente a los, 49385 que se registró en el censo del año 2010, observándose un incremento a nivel de distrito. Es importante considerar que en el distrito de Chepo se encuentra el río Mamoní, uno de los mayores ríos de Panamá, el cual confluyen con en el puerto de Coquirá, y además, cuenta con más de 55 ríos y quebradas, que adicionalmente cuenta con muchos problemas sanitarios, debido a que los residuos domésticos y aguas residuales de excretas son arrojados directamente a los ríos y quebradas sin tratamiento previo por la falta de alcantarillados, contaminando los recursos hídricos superficiales, subterráneos y las zonas costeras (McFeters *et al.*, 1993; PNUMA, 2003).

### **3.2.3 Aislamiento e identificación de *V. cholerae*, *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus* en muestra de bivalvos colectada de tres zonas de producción en Panamá.**

El género *Vibrio* es una de las poblaciones bacterianas más predominantes que pueden encontrarse de forma natural en los estuarios y ambientes marinos, aunque tienen funciones importantes como degradación de la materia orgánica y regeneración de nutrientes, pueden actuar como patógenos de organismos acuáticos de importancia comercial, o bien afectar al ser humano (Leyton y Riquelme, 2008). Es importante

mencionar que la mayoría de las especies de *Vibrio* aisladas de ambientes marinos son cepas no virulentas o poco virulentas (Robles *et al.*, 2013).

En cuanto al parámetro de detección de 3 especies de *Vibrio* (*V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*), se pudo aislar e identificar de manera presuntiva la presencia de Vibrios en los bivalvos muestreados, siendo *V. parahaemolyticus* el de mayor incidencia y distribución se encontró, al ser detectado en las 3 zonas de producción, y durante los 3 meses de muestreo de la estación seca, seguido por *V. cholerae* el cual solo fue detectado en una zona de producción (Playa Bique) durante el mes de abril, mientras que *V. vulnificus* no fue aislado ni identificado en ninguna de las 3 zonas durante la estación seca.

Su y Liu (2007), indican que el consumo de mariscos crudos o poco cocidos contaminados con *V. parahaemolyticus* puede conducir al desarrollo de gastroenteritis aguda caracterizada por diarrea, dolor de cabeza, vómitos, náuseas y calambres abdominales. Estos síntomas son consecuencia de dos hemolisinas presentes en las cepas patógenas de *V. parahaemolyticus*, las TDH y TRH, las cuales son importantes factores de virulencia; la TDH es el factor de virulencia más importante y responsable de producir infección entérica (Dabanch *et al.*, 2009). Sin embargo, es importante mencionar que no todas las cepas de *V. parahaemolyticus* son patógenas y que la mayoría de las cepas que se encuentran en el ambiente y en los moluscos, no son causantes de gastroenteritis (Lee *et al.*, 2010).

En cuanto a *V. cholerae*, estudios estuarinos y costeros de diferentes partes del mundo han demostrado que factores fisicoquímicos como la temperatura y salinidad juegan funciones importantes en la ocurrencia y ecología de *V. cholerae* (Leyton y Riquelme, 2008). Además, se ha reportado que hay una correlación positiva entre *V. cholerae* y la salinidad (Huq *et al.*, 2005). Dichos factores ambientales, el cambio y la variabilidad climáticos afectan el crecimiento y la reproducción en el medio marino (Robles *et al.*, 2013)

Aunque *V. vulnificus* no fue detectada, es importante mencionar que es una bacteria que está presente naturalmente en las áreas costeras cálidas y se encuentra en concentraciones más altas durante los meses de verano, cuando el agua está más caliente (FDA, 2022). También, se ha reportado que *V. vulnificus* es mucho más

susceptible a altos niveles de salinidad que *V. parahaemolyticus* (Salina *et al.*, 2020). Robles *et al.* (2013), señalan que la salinidad y la temperatura tienen una gran influencia en las poblaciones de *Vibrio*, y además, de otros factores bióticos y abióticos que están relacionados con la ocurrencia o concentración de *Vibrios* marinos patógenos. Adicionalmente, se indica que, en zonas tropicales y semidesérticas con temperaturas estables durante todo el año, la prevalencia de *Vibrio* puede verse afectada principalmente por los niveles de materia orgánica en la estación seca (Robles *et al.*, 2013; Deepanjali *et al.*, 2015). No obstante, Urakawa y Rivera (2006), indican que en aguas tropicales y subtropicales la variación de poblaciones de *Vibrios* es baja. Generalmente, las especies de *Vibrio* son más comunes en aguas cálidas, particularmente cuando la temperatura del agua es superior a 17°C (Thompson *et al.*, 2004).

**CAPÍTULO IV**

**CONCLUSIONES Y**

**RECOMENDACIONES**

#### 4.1 CONCLUSIONES

1. Las zonas de producción de Bique y El Espavé fueron ubicadas en la categoría A, Chinina se ubico en la categoría B; utilizando como parámetro los coliformes termotolerantes.
2. Las zonas de producción de Bique y El Espavé fueron ubicadas en la categoría A, Chinina en la categoría C ; utilizando como parámetro la *E. coli*.
3. Los meses de febrero y marzo fueron ubicados en la categoría C y abril fue ubicado en la categoría A, utilizando como parámetros a los coliformes termotolerantes . Para el parámetro de *E. coli* obtuvimos el siguiente resultados *el mes de febrero (categoría C), marzo (categoría B) y abril (categoría A)*.
4. Se detectó la presencia de *V. cholerae* en el área de Bique, para la especie *Leukoma* sp. en el mes de abril.
5. Se detectó la presencia en de *V. parahaemolyticus* en el área de Espavé, para la especie *Anadara* sp., de los meses de marzo y abril.
6. Se detectó la presencia de *V. parahaemolyticus* en el área de Chinina, para la especie *Donax* sp., del mes de marzo.

## 4.2 RECOMENDACIONES

Tomando en cuenta los resultados obtenidos en este estudio se recomienda:

1. No congelar las cepas aisladas de *Vibrio* por tiempo prolongado.
2. Tomar en cuenta los parámetros físicos y químicos del medio marino donde se obtiene la muestra de bivalvos.
3. Realizar encuestas en las comunidades aledañas para conocer el consumo de bivalvos en los lugares.
4. Realizar campañas de concientización sobre la correcta manipulación de bivalvos para consumo.
5. Hacer estudios sobre otros tipos de contaminación biológica en los moluscos como también, biotoxinas marinas.
6. Investigar las posibles causas de la contaminación, en las diferentes zonas de producción.

# **BIBLIOGRAFÍA**

- ACHIPIA (2017). *Vibrio parahaemolyticus*. Ficha de peligros/N.º 08/2017. <https://www.achipia.gob.cl/wp-content/uploads/2018/03/Ficha-Peligro-08-Vibrio-parah-v01.pdf>.
- León Robles A., E. Acedo Félix, B. Gomez-Gil, E. I. Quiñones Ramírez, M. Nevárez-Martínez and L. Noriega-Orozco (2013). Relationship of aquatic environmental factors with the abundance of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio mimicus* and *Vibrio vulnificus* in the coastal area of Guaymas, Sonora, Mexico, *Journal of Water and Health*. 11(4):700-712. doi: 10.2166/wh.2013.160
- ARAP (2012). Guía básica para el cultivo de moluscos bivalvos del Pacífico panameño: conchuela, ostras y concha negra, 2012. <https://aquadocs.org/bitstream/handle/1834/8123/Guia%20B%20a1sica%20para%20el%20cultivo%20de%20Molusco%20en%20Panam%20a1.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- BAM (2004) Bacteriological Analytical Manual. Chapter 9. *Vibrio*.
- BAM (2020). Bacteriological Analytical Manual apéndice 2. <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-appendix-2-most-probable-number-serial-dilutions>
- Bartram, J., & Ballance, R. (1996). *Water Quality Monitoring-A Practical Guide to the Design and Implementation of Freshwater Quality Studies and Monitoring Programs* Edited by Chapter 10-MICROBIOLOGICAL ANALYSES.
- Bio-mériux. (02 de 12 de 1989). "API 20E SISTEMA DE IDENTIFICACIÓN PARA Enterobacteriaceae Y OTROS BACILOS GRAM-NEGATIVOS. Obtenido de No. 20100. Biomériux S.A. (de.). Francia. 24 pp.: [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/API20E\\_18841.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/API20E_18841.pdf).
- Bofill, M Silvia.; Clemente, Casares Pilar; Albiñana, Giménez Néstor; Maluquer, de Motes; Porta, Carlos; Gonfa, Ayalkibet, Hundesa y Girones Llop, Rosina. (2005) Efectos sobre la salud de la contaminación de agua y alimentos por virus emergentes humanos. *Rev. Esp. Salud Pública*. 79(2):255.
- Canadian Shellfish Sanitation Program. 2010. Manual of operations. Chapter 2. Growing area survey and classification. Annex 2b. Bacteriological procedures.

10. CDC. (s. f.). Centers for Disease Control and Prevention. General Information. Cholera. <https://www.cdc.gov/cholera/general/index.html>
- CDC (2019). Who's more Likely to Get a Vibrio Infection? (7 octubre, 2019). Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/vibrio/es/wounds.html>
- CDC. (2019). E. coli and Food Safety | Features | Retrieved February 24, 2020, from <https://www.cdc.gov/Features/ecoliinfection/>
- Cisneros, B.J. (2011) Safe Sanitation in Low Economic Development Areas. Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53199-5.00082-8>
- Colwel Rita R. I; Grimes D. Jay. Nonculturable Microorganisms in the Environment (Softcover Reprint of the Original 1st 2000 ed. ed.). Springer.
- Córdova R. Stefanny K. (2015). Cuantificación de coliformes fecales en extractos de moluscos bivalvos usando el gen LacZ. Ensenada, Baja California, México. <https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1007/72/1/242631.pdf>
- Culligan Nation. (2017). Culligan United States & Canada. Coliform Bacteria: 5 Things You Should Know. <https://www.culligannation.com/coliform-bacteria/>
- Dabanch, J.; Herrero, D.; Pavés, C.; Veas, N.; Braun, S. y Porte, L. (2009). Bacteriemia por *Vibrio parahaemolyticus*: Reporte de caso y revisión de la literatura *Vibrio parahaemolyticus* bacteremia: Case report and literature review. Retrieved from [www.sochinf.cl](http://www.sochinf.cl)
- Darrigran, G. (2013). Los moluscos bivalvos. Recuperado diciembre 21, 2019, from [https://www.academia.edu/37787097/Los\\_moluscos\\_bivalvos](https://www.academia.edu/37787097/Los_moluscos_bivalvos)
- Dávalos, S. G. y Bonifacio, I.N. (2005). PATÓGENO OPORTUNISTA *VIBRIO VULNIFICUS*. [http://www.revista.unam.mx/vol.6/num4/art32/abr\\_art32.pdf](http://www.revista.unam.mx/vol.6/num4/art32/abr_art32.pdf)
- Deen, J.; Mengel M. A.; Clemens J. D. (2020); Epidemiology of cholera, Vaccine, Volume 38, Supplement 1, Pages A31-A40, ISSN 0264-410X, <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.07.078>.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X19309995>
- Deepanjali, A., Kumar, H. S. & Karunasagar, I. (2005) Seasonal variation in abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* bacteria in oysters along the Southwest Coast of India. 71:3575–3580.

- Díaz D., C.; Fall, C.; Quentin, E.; Jiménez M, M. C.; Esteller A., M.V.; Garrido H., S. E.; López V., C.M.; García P., D (2003). Agua potable para comunidades rurales, reúso y tratamientos avanzados de aguas residuales domésticas. Editor: RIPDA-CYTED. VirtualPro.co. <https://www.virtualpro.co/biblioteca/agua-potable-para-comunidades-rurales-reuso-y-tratamientos-avanzados-de-aguas-residuales-domesticas>
- Díaz, J.M., G. Melo, J.M. Posada, A. Piedra y E. Ross (2014). Guía de identificación: Invertebrados marinos de importancia comercial en la costa Pacífica de Colombia. Fundación MarViva. San José, Costa Rica. Pp 102.
- Donax Shell of the Donacidae Family | Mexico – Fish, Birds, Crabs, Marine Life, Shells and Terrestrial Life. (s.f.). Retrieved February 9, 2020, from <https://www.mexican-fish.com/donax-shell-of-the-donacidae-family/>
- EcuRed. (2010). Historia de Chame. Obtenida de: [https://www.ecured.cu/Distrito\\_Chame](https://www.ecured.cu/Distrito_Chame).
- ELIKA. (2012). Moluscos Bivalvos: Medidas para evitar Riesgos. <https://pesca.elika.eus/wp-content/uploads/articulos/Archivo1287/berezi@%2032%20-%20MOLUSCOS%20BIVALVOS.pdf>
- Espinosa, D., Girón, G., González, P., López, M., & Velázquez, K (2020). Microbiología y calidad del agua: Prueba de coliformes fecales. COLIFORMES. LaWebdelQFB. <http://lawebdelqfb.com/cuerpo/>
- Euskadi.eus. (2018). Zonas de producción de moluscos - Pesca y Acuicultura. Recuperado Febrero 24, 2020, from <https://www.euskadi.eus/zonas-produccion-moluscos/web01-a2arraku/es/>
- FAO.org (2003). Evaluación de riesgos de Campylobacter spp. en pollos para asar y Vibrio spp. en pescados y mariscos. Sección 6. Evaluación De Riesgos De Vibrio Spp. En Pescados Y Mariscos. [online] disponible en: <http://www.fao.org/3/y8145s/y8145s08.htm>.
- FAO, WHO (2000). Proposed draft code of practice for fish and fishery products Codex Alimentarius (29th Session). Extracts relevant to live bivalve molluscs. <https://www.fao.org/3/x7603e/x7603e09.htm>

- FAO y OMS. 2022. Código de prácticas para el pescado y los productos pesqueros. Roma. <https://doi.org/10.4060/cb0658es>
- Food and Drug Administration (FDA) (2012). Bad Bug Book Handbook of Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins.
- FDA. (s.f.). Bacteriological Analytical Manual <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bacteriological-analytical-manual-bam>
- FDA. (s.f.) Vibrio vulnificus Materiales de Educación para la Salud <https://www.fda.gov/food/health-educators/vibrio-vulnificus-materiales-de-educacion-para-la-salud>
- García, M. (2000). Estirpes de Escherichia coli productoras de la lesión de adhesión y borrado. Obtenido de: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=198251>
- Garrido, L.; Robinson, A. y Sánchez, N (2018). Determinación de la calidad microbiológica de las zonas de producción de los bivalvos *Donax punctatostriatus*, *Protothaca asperrima* y *Anadara tuberculosa* en Panamá. Tesis de Licenciatura. Universidad de Panamá.
- Gómez, G.; Yau I. y Guevara, I (2016). Calidad Microbiológica de las Zonas de Producción de los Bivalvos *Anadara grandis*, *Protothaca asperrima* y *Anadara tuberculosa* en Panamá. Tesis de Licenciatura. Universidad de Panamá.
- González, M. I.; Torres, T y Chiroles, S (2003). Calidad microbiológica de aguas costeras en climas tropicales. Revista electrónica de la Agencia de Medio Ambiente Año 3, No.4, 2003 ISSN-1683-8904. <http://ama.redciencia.cu/articulos/4.02.pdf>
- Gonzalo, M (2016). Moluscos: propiedades y nutrientes - canalSALUD. Recuperado diciembre 27, 2019, de <https://www.salud.mapfre.es/nutricion/alimentos/moluscos/>
- Gosling, E. (2004). Bivalve Molluscs Biology, Ecology and Culture.
- Guerrero, J. 2010. Puerto Coquira. Obtenida de: [www.actiweb.es/jessyguerrero/puerto\\_coquira.htm](http://www.actiweb.es/jessyguerrero/puerto_coquira.htm).
- Health, M. D. of (2019). Coliform Bacteria Fact Sheet - EH: Minnesota Department of Health. Recuperado Febrero 24, 2020, de:

<https://www.health.state.mn.us/communities/environment/water/factsheet/coliform.html>

- Helm, M. M., Bourne, N., Lovatelli, A., Tall, M.L., y Cigarría, J (2006). Cultivo de bivalvos en criadero: un manual práctico. Fao.
- Huq, A., Sack, R. B., Nizam, A., Longini, I. M., Nair, G. B., Ali, A., Morris, J. G., Khan, M. N. H., Siddique, A. K., Yunus, M., Albert, M. J., Sack, D. A. & Colwell, R. R. (2005) Critical factors influencing the occurrence of *Vibrio cholerae* in the environment of Bangladesh. 71:4645–4654.
- ICMSF.org (2006). Guía simplificada para el entendimiento y uso de objetivos de inocuidad de los alimentos y objetivos de rendimiento. [online] Disponible en: <<http://www.icmsf.org/wp-content/uploads/2018/02/GuiaSimplificadospdf>
- Jones, M. K (2009). *Vibrio vulnificus*: Disease and Pathogenesis. Infection and Immunity. <https://iaia.asm.org/content/77/5/1723.short>
- Jozić, S., Šolić, M., & Krstulović, N (2012). The accumulation of the indicator bacteria *Escherichia coli* in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and oysters (*Ostrea edulis*) under experimental conditions.
- Kaper, J. B (1995). Cholera. *Clinical Microbiology Reviews*. <https://cmr.asm.org/content/8/1/48>
- Kaysner, C.; DePaola, A (2017). Método para la determinación de *Vibrio cholerae* en alimentos, hielo y agua. 1–24. Retrieved from [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/patogNOMVibrio\\_17366.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/patogNOMVibrio_17366.pdf)
- Kaysner, C. A.; DePaola, Jr., A. y Jones. J (2004). BAM: *Vibrio* | FDA. Recuperado Febrero 24, 2020, de <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-vibrio>
- Khan, F.M., Gupta, R. (2020). *Escherichia coli* (*E. coli*) as an Indicator of Fecal Contamination in Groundwater: A Review. In: Jeon, HY. (eds) Sustainable Development of Water and Environment. Environmental Science and Engineering. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-45263-6\\_21](https://doi.org/10.1007/978-3-030-45263-6_21)
- Kittana, H; Gomes-Neto J. C.; Heck K.; Geis A. L.; Muñoz R. R. S; Cody L.A.; Schmaltz R.J.; Bindels L. B.; Sinha R.; Hostette J. M.; Benson A. K.; Ramer-Tait A. E. (2018)

Commensal *Escherichia coli* Strains Can Promote Intestinal Inflammation via Differential Interleukin-6 Production.

Lee, R.; Lovatelli, A.; Ababouch, L (2010). Depuración de bivalvos: aspectos fundamentales y prácticos. In FAO Fisheries and Aquaculture. Retrieved from <http://www.fao.org/3/y5720s/y5720s06.htm>

León Robles A., E. Acedo Félix, B. Gomez-Gil, E. I. Quiñones Ramírez, M. Nevárez-Martínez and L. Noriega-Orozco (2013). Relationship of aquatic environmental factors with the abundance of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio mimicus* and *Vibrio vulnificus* in the coastal area of Guaymas, Sonora, Mexico, Journal of Water and Health. 11(4):700-712. doi: 10.2166/wh.2013.160

Leyton, Y., y Riquelme, C (2008). Vibrios en los sistemas marinos costeros. Revista de Biología Marina y Oceanografía. 43(3):441–456. <https://doi.org/10.4067/s0718-19572008000300004>

Madigan, M. T., Martinko J.M., Bender K.S., Buckley D.H. y Stahl D.A (2015). Brock: Biología De Los Microorganismos (14.a ed.). Pearson Educación. <https://drive.google.com/file/d/15wu9MzsX8rYyXeRLx5pbNnkwiTZQrAMC/view>.

Martínez, E.N. y Villalobos De Bastardo L. B (2005). Escherichia coli ENTEROPATÓGENA EN MOLUSCOS CRUDOS Y COCIDOS Enteropathogenic Escherichia coli in Raw and Cooked Molluscs. <http://www.saber.ula.ve/bitstream/handle/123456789/28305/art10.pdf?sequence=2&isAllowed=y/>

Martínez Cáceres, J.; Yeomans, R. V.; Tapia Vázquez, O.; Morales, V.; Morales, R.; Marcos, R.; García Suárez, O (2014). Manual de Buenas Prácticas para el Manejo de Cultivo de Moluscos Bivalvos. OIRSA - OSPESCA pp. 117

McFeters G, Barry J, Howington J (1993). Distribution of enteric bacteria in antarctic seawater surrounding a sewage outfall. Water Res. 27: 645-650.

McLandsborough, L (2004). Food Microbiology Laboratory (1.a ed.). CRC Press.

Muñoz, D., Graü de Marín, C., Villalobos de B., L. B., Martínez, C., & Zerpa, A. (2008). Indicadores bacterianos en los mejillones perna perna (linné, 1758) y p. viridis

- (linné, 1758) y en las aguas de extracción de bivalvos procedentes de la costa norte y sur del estado Sucre, Venezuela. *Revista Científica*, XVIII (5), 595-606.
- Nishibuchi, M.; DePaola, A (2005). *Foodborne pathogens: microbiology and molecular biology 2005* pp.251-271 ref.many. Editor Fratamico, P. M.; Bhunia, A. K.; Smith, J. L.
- OMS y FAO (2012). Código de prácticas para el pescado y los productos pesqueros. <http://www.fao.org/>. <http://www.fao.org/3/i2382s/i2382s.pdf>  
[http://www.fao.org/tempref/codex/Publications/Booklets/Practice\\_code\\_fish/CCF\\_FP\\_2012\\_ES.pdf](http://www.fao.org/tempref/codex/Publications/Booklets/Practice_code_fish/CCF_FP_2012_ES.pdf)
- OMS. Organización Mundial de la Salud (2018). E. coli. Retrieved February 24, 2020, from <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>
- PNUMA (2003). *Perspectivas del Medio Ambiente Mundial GEO 3*. Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente. Mundi Prensa. Madrid, España. 410 pp.
- Quiñones, R. Elsa I. Vázquez, S. Carlos Pedroche, Francisco F. Moreno, Sepúlveda L. y Rodas Suárez O. R (2000). Presencia de los géneros *Vibrio* y *Salmonella*, y detección de coliformes fecales en almejas del Golfo de México.
- Ratna, R. V. (2018). *Economic Analysis of Health Impacts in Developing Countries*. Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences. doi:10.1016/b978-0-12-409548-9.10939-x
- Recio, G (2016). Bivalvos, características y clasificación. Recuperado Febrero 9, 2020, de <https://invertebrados.paradais-sphynx.com> website: <https://invertebrados.paradais-sphynx.com/moluscos/bivalvos-caracteristicas-clasificacion.htm>
- Rivero Rodríguez, Susana (2009). Diagnóstico del cultivo y extracción de moluscos en Centroamérica. Hacia una estrategia regional. [https://www.sica.int/busqueda/busqueda\\_archivo.aspx?Archivo=odoc\\_57641\\_1\\_09032011.pdf](https://www.sica.int/busqueda/busqueda_archivo.aspx?Archivo=odoc_57641_1_09032011.pdf)
- Saldaña Betzy, Velásquez Amelia, Lorenzo Iliana (2006). Determinación de la Calidad Microbiológica de las Zonas de Producción de los Bivalvos *Donax puntatrostiatus*,

- Protothaca asperrima* y *Anadara tuberculosa* en Panamá. Tesis de Licenciatura. Universidad de Panamá.
- SERNAPESCA. Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura (2015). Programa de Sanidad de Moluscos Bivalvos. Norma Técnica Sección 1. Clasificación y monitoreo de las Áreas de Extracción de Moluscos Bivalvos Estados Unidos. Departamento de Sanidad Pesquera. Chile.[http://www.sernapesca.cl/sites/default/files/parte\\_ii\\_seccion\\_i\\_control\\_en\\_origen\\_version\\_15.06.18.pdf](http://www.sernapesca.cl/sites/default/files/parte_ii_seccion_i_control_en_origen_version_15.06.18.pdf)
- Smithsonian Environmental Research Center (2013). From the Field: A Warm Welcome in Bique
- Su, Y. C., & Liu, C. (2007). *Vibrio parahaemolyticus*: a concern of seafood safety. PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17418305/>
- Thompson, F. L., Iida, T. & Swings, J. (2004) Biodiversity of Vibrios. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68:403–431.
- Thompson JR y MF Polz (2006). Dynamics of *Vibrio* populations and their role in environmental nutrient cycling. *The biology of vibrios*. 13:190-203. ASM Press, Washington DC
- Trigo, J. E.; Mosquera. E.R. y Troncoso J. S (2019). (PDF) Filo Mollusca. Clase BIVALVIA. Recuperado: Febrero 9, 2020, de [https://www.researchgate.net/publication/331482118\\_Filo\\_Mollusca\\_Clase\\_BIVALVIA](https://www.researchgate.net/publication/331482118_Filo_Mollusca_Clase_BIVALVIA)
- Vázquez Sylvia, Q. F. S. O. y D. M. L (2013). IMPORTANCIA DE LOS COLIFORMES EN LOS ALIMENTOS.
- VILLALOBOS, DE B. L. B.; ELGUEZÁBAL, L.; SÁNCHEZ, I (1997). Efecto de la precipitación atmosférica en la calidad sanitaria del bivalvo *Pinctada imbricata* comercializado en Cumaná, estado Sucre. XLVII convención anual de la AsoVAC. *Acta científica venezolana*, 48 (Supl. 1): 144.
- WHO. World Health Organization (2012). Preguntas más frecuentes e información para los viajeros acerca del cólera. Organización Mundial de la Salud. <https://www.who.int/topics/cholera/faq/es/>

WHO. World Health Organization (2019). Cólera. Organización mundial de la salud.  
<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cholera>

3M (s.f.). Coliformes. Recuperado Febrero 24, 2020, de  
[https://www.3m.com.ar/3M/es\\_AR/food-safety-la/biblioteca-de-documentos/microorganismos/coliformes/](https://www.3m.com.ar/3M/es_AR/food-safety-la/biblioteca-de-documentos/microorganismos/coliformes/)

# **ANEXO**

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

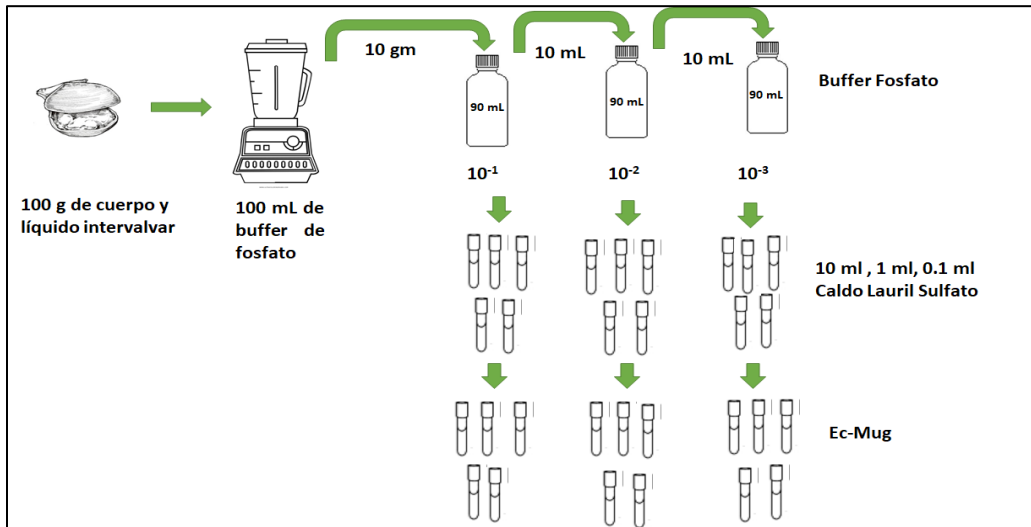
**Solución 1** (Solución stock buffer fosfato): se disolvió 3.4 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (fosfato de potasio monobásico) en 50 mL de agua destilada [1N NaOH en pH 7.2] y se aforó hasta los 100 mL.

**Solución 2** (Solución de sulfato): se disolvió 8.7 g de  $\text{MgSO}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (sulfato de magnesio heptahidratado) en 100 mL de agua destilada.

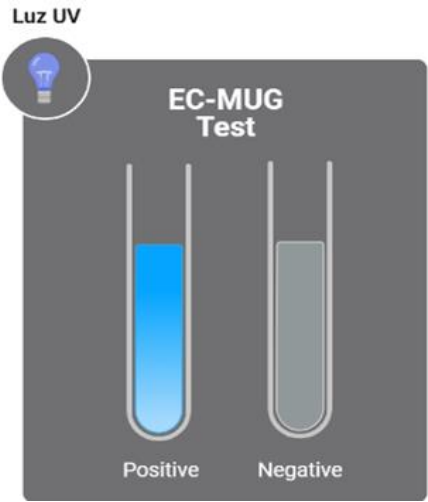
**Mezcla** (Preparación de Buffer Fosfato): Se añadió 1.25 mL de la solución stock buffer fosfato + 5.0 mL de la solución de sulfato se aforo hasta 1 L de agua destilada.



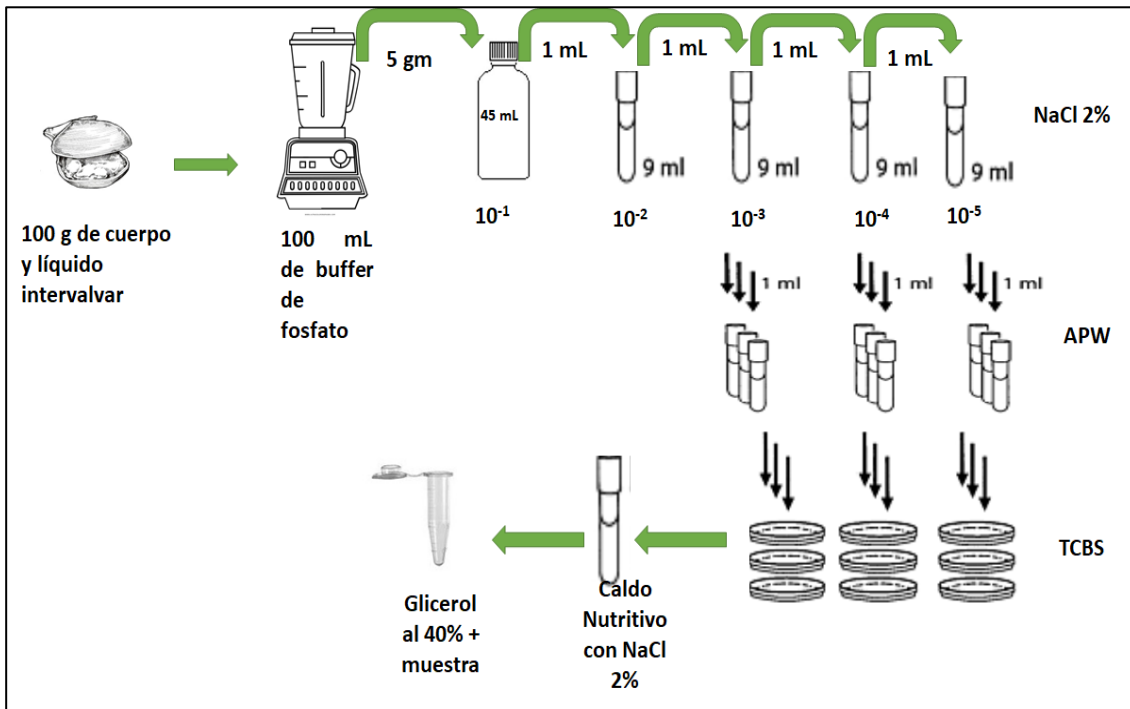
**Figura. 8** Especies de Bivalvos estudiadas A) *Anadara sp.* B) *Leukoma sp.* C) *Donax sp.*



**Figura. 9** Diagrama de procesamiento de las muestras de moluscos Bivalvos.



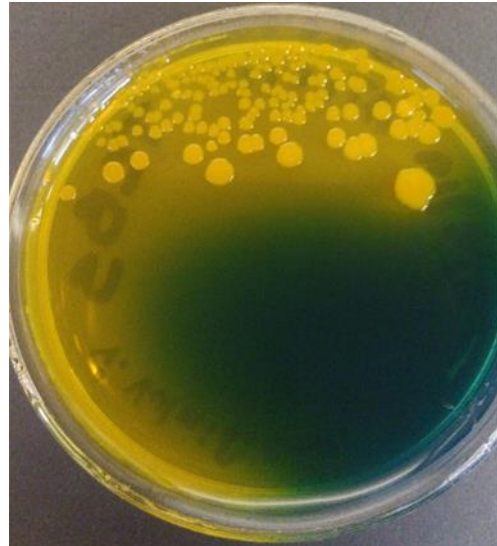
**Figura. 10** Resultados positivos y negativos de *E. coli* en prueba de fluorescencia con EC-MUG.



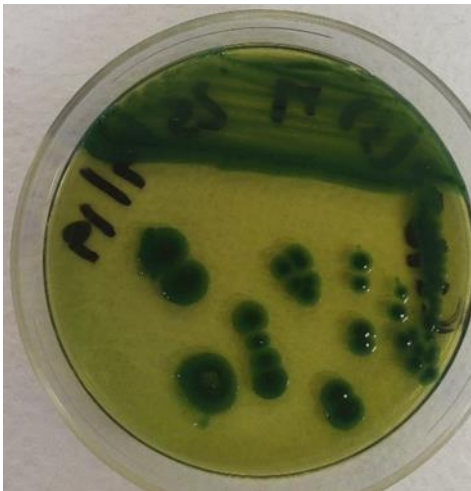
**Figura. 11** Esquema de dilución de muestras de moluscos bivalvos para pruebas de *Vibrio* sp.



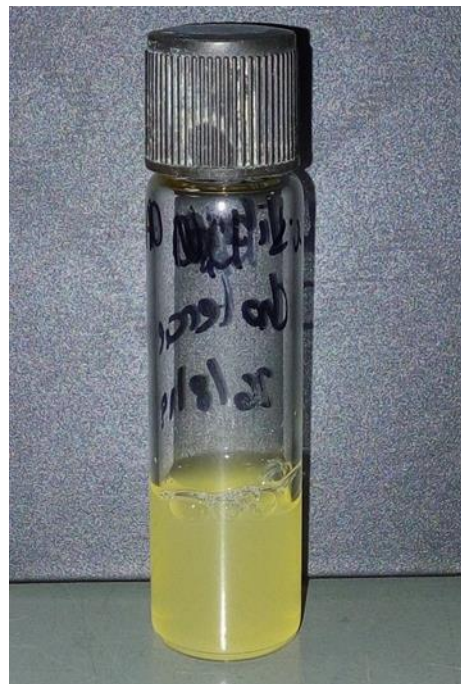
**Figura. 12** . APW (Agua alcalina peptonada)



**Figura. 14** UFC (Unidades formadoras de colonias) amarillas en TCBS (Agar tiosulfato citrato bilis sacarosa)



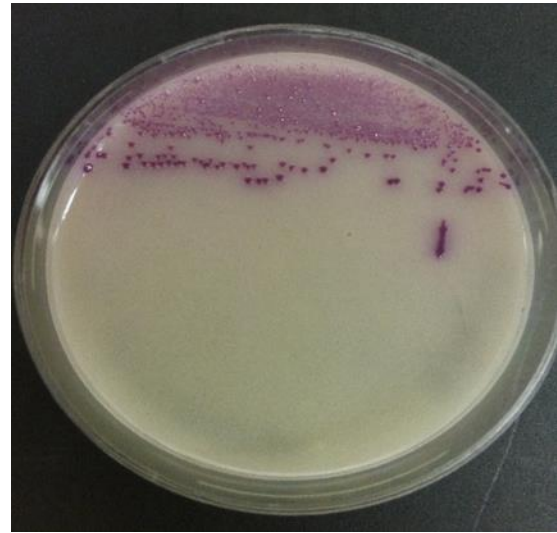
**Figura. 13** . UFC (Unidades formadoras de colonias) verdes en TCBS (Agar tiosulfato citrato bilis sacarosa)



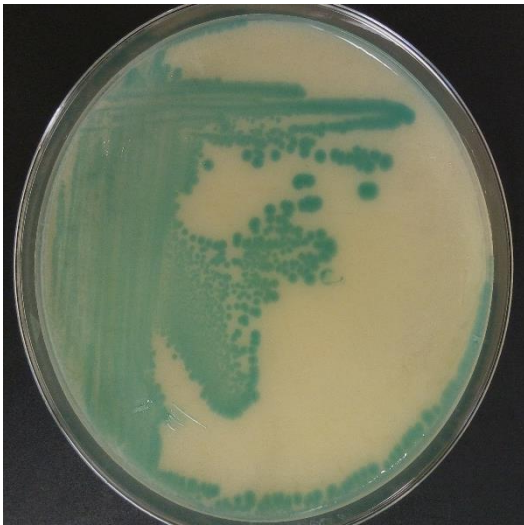
**Figura. 15** *Vibrio* sp. en caldo nutritivo con NaCl 2



**Figura. 16 .** *Vibrio* sp. en agar nutritivo con NaCl 2%.



**Figura. 18** UFC (Unidad formadoras de colonias) violetas en Hardy Chrom Vibrio



**Figura. 17** UFC (Unidad formadoras de colonias) turquesas en Hardy Chrom Vibrio