

**UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL
FACULTAD DE CIENCIA NATURALES
MAESTRÍA EN CIENCIAS MANEJO SUSTENTABLE
DE RECURSOS BIOACUÁTICOS Y MEDIO AMBIENTE**

**Tesis de Grado para la obtención del Título de Magíster en Ciencias con Énfasis en
Manejo Sustentable de Recursos Bioacuáticos y Medio Ambiente**

**“NIVELES DE Coliformes totales y *Escherichia coli* EN
BIVALVOS DE INTERÉS COMERCIAL *Ostrea
columbiensis* y *Mytella guyanensis* (Molusca: Bivalvia)
COMO BIOINDICADOR DE CONTAMINACIÓN
MICROBIOLÓGICA EN EL ESTERO PUERTO
HONDO, PROVINCIA DEL GUAYAS – ECUADOR”**

BLGA. ROSA SIGUENCIA GARCÍA

GUAYAQUIL – ECUADOR

2010

CERTIFICACIÓN DEL TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

DIRECTOR DE MAESTRÍA

DECANA

DEDICATORIA

Esta tesis la dedico a mi Dios, porque nunca me abandono en el largo andar de mi aprendizaje, siempre estuvo a mi lado dándome salud, fortaleza y sabiduría. A mis queridos padres Ramón y Zoila por darme su amor, consejos y su apoyo en todo momento de mi vida, a mis adorados hijos Diego y Yamell porque ellos son la razón para salir adelante, a mi amado esposo por su ayuda y comprensión, a mi hermana Gloria que siempre me brinda su apoyo en los momentos que necesitaba.

Para todos ustedes este es mi regalo de amor.

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer a Dios por estar siempre a mi lado, agradezco a las autoridades del Instituto de Investigaciones de Recursos Naturales de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad de Guayaquil por el apoyo brindado para poder realizar los ensayos dentro de las Instalaciones del Laboratorio de Microbiología.

Mi agradecimiento al M.Sc. Rubén Castro R. Tutor de la tesis por su valioso apoyo en el desarrollo de la misma.

Un profundo agradecimiento a mi tutor externo el Dr. Miguel Uyaguari D, por su apoyo incondicional y sus valiosos conocimientos para que se lleve a cabo este estudio.

Agradezco a los señores miembros de mi comité evaluador por su interés en formar parte de este proyecto.

Mi agradecimiento también a mis amigos que de una u otra forma contribuyeron en el desarrollo de este estudio, también a la Sra. Jacqueline Zambrano mi agradecimiento por su colaboración con las pangas para la recolección de las muestras de bivalvos en el Estero Puerto Hondo

ÍNDICE DE CONTENIDO

Índice de Tablas	vi
Índice de Figuras	vii - viii
Resumen	ix
Abstract	x
1. Introducción	1-3
2. Revisión de Literatura	4-6
3. Materiales y Métodos	7-15
3.1. Área de Estudio	7-9
3.2. Fase de Campo	9-11
3.2.1. Colección de las Muestras	9-11
3.3. Fase de Laboratorio	11-15
3.4. Análisis Estadístico	15
4. Resultados	16-23
5. Discusión	24-27
6. Conclusiones y Recomendaciones	28 -29
7. Abreviaturas Utilizadas	30-31
8. Referencias Bibliográficas	32-35
9. Apéndice	36- 48

INDICE DE TABLAS

Tabla1. Estaciones de muestreo y coordenadas del área de estudio.	9
Tabla 2. Características del medio y distribución de <i>Ostrea columbiensis</i> y <i>Mytella guyanensis</i>	12
Tabla 3. Características bioquímicas de Coliformes totales y <i>E.coli</i>	14
Tabla 4. Niveles de Coliformes totales y <i>E. coli</i> en <i>Mytella guyanensis</i> y <i>Ostrea columbiensis</i>	17
Tabla 5. Análisis estadísticos de Coliformes totales en <i>Mytella guyanensis</i> , septiembre - octubre 2009	20
Tabla 6. Modelos para Coliformes totales en <i>Mytella guyanensis</i>	42-43
Tabla 7. Análisis estadísticos de <i>E.coli</i> en <i>Mytella guyanensis</i> , septiembre - octubre. 2009.	20
Tabla 8. Modelos para <i>E.coli</i> en <i>Mytella guyanensis</i>	44 -45
Tabla 9. Análisis estadísticos de Coliformes totales en <i>Ostrea columbiensis</i> , septiembre - octubre. 2009.	21
Tabla 10. Modelos para coliformes totales en <i>Ostrea columbiensis</i>	46 - 47
Tabla 11.- Parámetros físicos registrados en las 4 estaciones, septiembre y octubre del 2009.	48
Tabla 12.- Parámetros químicos registrados en las 4 estaciones, septiembre y octubre del 2009.	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Imágenes de la ubicación del área, Google 2004. Tomadas el 05 de septiembre del 2009.	8
Figura 2. Ubicación Geográfica de la estación 1.	32
Figura 3. Ubicación Geográfica de la estación 2.	33
Figura 4. Ubicación Geográfica de la estación 3.	34
Figura 5. Ubicación Geográfica de la estación 4.	35
Figura 6. Recolección de <i>Ostrea columbiensis</i> en las raíces de <i>Rizophora mangle</i> durante los meses de septiembre – octubre/2009.	10
Figura 7. Recolección de <i>Mytella guyanensis</i> del sustrato arenoso – fangoso durante los meses de septiembre - octubre /2009.	10
Figura 8. Determinación de pH en el laboratorio del IIRN durante los meses de septiembre- octubre /2009.	36
Figura 9. Lavado de los organismos con solución salina en el Laboratorio del IIRN durante los meses de septiembre- octubre /2009.	36
Figura 10. <i>Ostrea columbiensis</i> 59.40 mm	13
Figura 11. <i>Mytella guyanensis</i> 34.40 mm	13
Figura 12. Determinación de coliformes y <i>E.coli</i> por cuenta en placa Tomado de Camacho <i>et al</i> 2009.	39
Figura 13. Preparación de diluciones decimales empleando tubos con 9.0 ml de solución salina.	40
Figura 14. Incubación de las placas a 35-37°C por el lapso de 24 - 48 horas	40
Figura 15. Contaje de coliformes totales y <i>E.coli</i> .	41

Figura 16. Confirmación de <i>E. coli</i> con la prueba de indol usando el reactivo de Kovacs.	41
Figura 17. Niveles de Coliformes totales en <i>Mytella guyanensis</i> , septiembre – octubre/ 2009.	18
Figura 18. Niveles de Coliformes totales en <i>Ostrea columbiensis</i> , septiembre – octubre/ 2009.	18
Figura 19. Niveles de <i>E.coli</i> en <i>Mytella guyanensis</i> , septiembre – octubre/ 2009.	19
Figura 20. Rangos de temperatura, septiembre - octubre del 2009.	22
Figura 21. Rangos de pH, septiembre - octubre del 2009.	22
Figura 22. Rango de salinidad, septiembre - octubre del 2009.	23
Figura 23. Rangos de Oxígeno Disuelto y Demanda Biológica de Oxígeno, septiembre - octubre del 2009.	23

RESUMEN

Este estudio examinó los niveles de Coliformes totales y *E. coli* como Bioindicadores de contaminación en dos especies de moluscos bivalvos (*Mytella* y *Ostrea*) en cuatro estaciones del estero Puerto Hondo durante la época seca con el propósito de evaluar la presencia de estos microorganismos y la inocuidad bacteriana de los moluscos extraídos de esta zona desde el punto de vista sanitario.

El rango de los resultados obtenidos de coliformes totales fue de 20 a 815 UFC/g. y de 20 a 350 UFC/g para *E.coli* en todas las muestras de *Mytella* con excepción de la muestras de *Ostrea* que no hubo presencia de *E.coli*. Las concentraciones encontradas de estos bioindicadores de contaminación indican que los bivalvos estudiados no son aptos para el consumo humano y que el estero donde fueron recolectados, se encuentra contaminado con aguas residuales que no han sido tratadas.

Palabras claves: Bivalvos, Niveles, Bioindicador, Contaminación, Organismos.

ABSTRACT

In the present study levels of total coliforms and *E. coli* as pollution bioindicators were examined in two bivalve mollusks (*Mytella* and *Ostrea*) in four sampling sites at Puerto Hondo during dry season in order to evaluate presence of these microorganisms and the bacterial harmfulness for human of these mollusks harvested from this zone from a sanitary point of view. The range for total coliforms was 20 to 815 CFU/g and from 20 to 350 FCU/g for *E. coli* in *Mytella* samples, in *Ostrea* *E. coli* was absent. Concentration of these pollution bioindicators pointed out that studied bivalves harvested in this area are not suitable for human consumption and site where samples were collected are polluted by untreated sewage water.

Key Word: Bivalve, levels, bioindicator, pollution, Organisms.

1. INTRODUCCIÓN

La contaminación marina es uno de los problemas que influye en la salud de los ecosistemas costeros, está relacionada con el crecimiento poblacional que habitan en las zonas costeras, aumentando las actividades domésticas, agrícolas e industriales que por el mal manejo y inadecuado control de los desechos sólidos y líquidos, afectan al medio marino (Martín *et al.*, 2004; *fide* Ramos *et al.*, 2008).

Las aguas con fines recreativas como las playas, se encuentran cercanas a las áreas urbanas, donde existe contaminación por heces fecales provocando la presencia de microorganismos patógenos causantes de enfermedades en la salud humana. Por lo que es importante un control sanitario de riesgos microbiológicos que constituye una medida sanitaria básica para mantener la salud de la población. (Garay *et al.*, 2002; *fide* Ramos *et al.*, 2008).

Los coliformes se encuentran en las plantas, el suelo, animales y en el tracto intestinal de los humanos. La presencia de estas bacterias nos indica que el agua está contaminada con aguas servidas y otros desechos en descomposición. Generalmente, las bacterias coliformes se encuentran en mayor abundancia en la capa superficial del agua o en los sedimentos. (Munn, 2004)

En los bivalvos existen factores importantes como agentes transmisores de microorganismos que producen enfermedades en el hombre. Entre los factores se destaca su alimentación mediante la filtración del agua (Cortés y Lara, 2003).

En Puerto Rico, consumen productos pesqueros crudos como la almeja (*Lucina pectinata*) y el ostión de mangle (*Crassostrea rhizophorae*), los ostiones son habitantes naturales del mangle rojo (*Rhizophora mangle*) donde se localizan adheridos a la superficie de las raíces y las almejas se encuentran en el fondo de estas áreas costeras. Estos bivalvos tienen la capacidad de concentrar microorganismos en su interior debido a que se alimentan

por mecanismos de filtración, todos los microorganismos y bacterias patógenas asociadas a los alimentos tienen como principal síntoma clínico, la gastroenteritis (Fontáñez, B., 2005), según (Villalobos y Elguezabal, 1994) indican que una de estas bacterias enteropatógena, causante de enfermedades gastrointestinales en los humanos es la *Escherichia coli*.

En el Golfo de Guayaquil, las aguas del Estero Salado adyacentes al centro urbano de la ciudad de Guayaquil, hasta hace unos 30 años, eran abundantes en peces, camarones y otras especies de interés comercial. Así mismo, el Estero Salado era visitado como un lugar de recreación de las familias Guayaquileñas. Actualmente, debido a la contaminación causada por las descargas domésticas e industriales de la ciudad de Guayaquil, este recurso natural se ha reducido en diversidad y cantidad (Estrella, 2000). Al oeste de la ciudad de Guayaquil, como parte del complejo hídrico que forma al Estero Salado, se encuentra el Estero Puerto Hondo (EPH) que por las condiciones ambientales actuales representa una de las zonas menos impactadas (Cuenca *et al.*, 2006).

El Estero Puerto Hondo está rodeado de manglares, entre las complicadas raíces aéreas de esta vegetación arbórea se reproducen invertebrados marinos, como bivalvos y crustáceos, los cuales van a formar el primer nivel de las cadenas alimentaria, cuyos estadios superiores terminarán, a muchas millas marinas de distancia. Las raíces de los manglares además permiten la fijación de animales sésiles, por lo que cada centímetro cuadrado de mangle sumergido sirve de sustrato a una gama de algas e invertebrados marinos. Las complejas ramificaciones que forman las raíces del manglar constituyen, también, un hábitat idóneo para que una gran diversidad de animales se proteja de sus predadores. Por otro lado, los residuos de manglares pueden constituir sustancias nutritivas para microscópicas diatomeas y algas verde-azules que constituyen la alimentación fundamental de muchos peces e invertebrados (Estrella, 2000).

Adicionalmente, el Estero Puerto Hondo constituye un área importante debido a que en ella se realizan múltiples actividades socioeconómicas, entre las que se destacan: la

extracción de recursos pesqueros, como la pesca blanca, extracción de jaibas (*Callinectes sp.*), cangrejos (*Ucides sp.*), ostiones (*Ostrea sp.*), y mejillones (*Mytella sp.*). Estas actividades se ven afectadas actualmente por la contaminación causada por descargas urbanas e industriales debido al crecimiento poblacional, la falta de sistemas de plantas de tratamiento de agua, presencia de centros educativos, camaroneras, haciendas y muelles (MAE, 2008). El propósito principal de esta investigación radicó en identificar taxonómicamente los bivalvos (*Ostrea columbiensis* y *Mytella guyanensis*), de interés comercial del área de estudio, determinar cualitativamente y cuantitativamente Coliformes totales y *E. coli*. en *Ostrea columbiensis* y *Mytella guyanensis*, y establecer la relación de los parámetros físicos químicos con los niveles de contaminación microbiológica; además de emplear la *Ostrea columbiensis* y *Mytella guyanensis* como bioindicadores para establecer las condiciones sanitarias y ambientales del estero Puerto Hondo. Finalmente, determinar si los bivalvos extraídos en esta zona son aptos para consumo desde el punto de vista microbiológico.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

La investigación sobre bacterias totales y fecales han sido ampliamente estudiada en diversos ecosistemas, al igual que diversos tipos de moluscos han sido utilizados como organismos bio-indicadores de contaminación microbiana. Por ejemplo en Maputo, Mozambique, se realizó un estudio encaminado a investigar la distribución estacional de *Escherichia coli* y *Salmonella*, en las almejas de la Bahía de Maputo, y examinar su patogenicidad y patrones resistentes a los antibióticos. El método estándar de tubos múltiples, reveló que la concentración de coliformes en todas las muestras excedió el límite para el consumo directo, de acuerdo con las normas de la Unión Europea relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios (REGLAMENTO CE N° 2073/2005 de la Comisión). Treinta y ocho por ciento de las muestras contenían > 60 000 NMP por cada 100 gramos de carne.

Igualmente Croci *et al.* (2006), estudiaron la incidencia y la circulación de diversas tensiones de la hepatitis A y Norovirus en 235 muestras de crustáceos (*Ruditapes philippinarum*, *Mytilus galloprovincialis*, *Ostrea spp.* y *Clámide spp.*) obtenidos de diversos sitios de las áreas de la producción de los crustáceos del mar adriático noroeste. Examinados para determinar la incidencia de contaminación por *Escherichia coli* y salmonella, revelando que ninguna de las muestras presenta salmonella, y el 93% de las muestras presentaron *Escherichia coli* por debajo del límite de la legislación europea la especie *Ruditapes philippinarum* fue la más posible contaminada con un rango de 230 MPN/100.

En otros estudios realizados por Mormanno *et al.* (2005), se recolectaron 600 muestras de moluscos (*Mytilus galloprovincialis*) de diferentes mercados de la región de Puglia (Italia), para determinar la presencia de *V. vulnificus*, *parahaemolyticus*, coliformes totales, *Escherichia Coli* y salmonella. En esta investigación se demostró que de las 600 muestras de *M. galloprovincialis* analizadas, se determinó que en 47 muestras contenían *V. parahaemolyticus*, 17 muestras presentaron *V. vulnificus*, *Salmonella spp.* se presentó en

28 muestras mientras que coliformes fecales presento valores por encima del límite permitido (> 300) y *Escherichia Coli* en 21 de las muestras.

Fontáñez, B. (2005) determinó el perfil microbiológico de la almeja, del ostión de mangle y las aguas de extracción de bivalvos de la zona suroeste de Puerto Rico mediante el análisis de coliformes fecales, *Salmonella* spp., *Vibrio* spp; y el recuento total en placas. Se recolectaron muestras de dos áreas del suroeste de Puerto Rico. (Boquerón y Lajas) entre los meses de julio de 2003 a junio de 2004. Se encontraron densidades de coliformes fecales entre $0.48-1.97 \log^{10} \text{ ufc g}^{-1}$ o ml^{-1} . Las densidades de vibrios estuvieron entre $0.48-5.04 \log^{10} \text{ ufc g}^{-1}$ o ml^{-1} . Los recuentos totales fluctuaron entre $2.40-5.61 \log^{10} \text{ ufc g}^{-1}$ o ml^{-1} . No se detectó la presencia de *Salmonella* en ninguna de las muestras. La mayoría de las muestras estuvieron en cumplimiento con las regulaciones de la “National Shellfish Sanitation Program (NSSP)”, resultados de este estudio no se pudo determinar una correlación significativa entre las densidades de vibrios y las variables físico-químicas como la salinidad, el pH, la concentración de oxígeno disuelto o la temperatura.

Quiñónez *et al.* (2000), realizaron una investigación en 260 muestras de almejas durante un ciclo anual en el estado de Veracruz, Golfo de México, con este estudio determinaron que el 100% de las almejas presentó coliformes fecales con valores de 10^1 a 10^6 NMP/g. La incidencia de coliformes fecales indicó que existe contaminación del agua con heces.

En un estudio realizado por Jiménez. (1998), en el Estero Salado de Guayaquil para determinar la concentración de coliformes totales, demostró que la mayor abundancia de este grupo se registró en las estaciones: las Monjas, Policentro, Ciudadela Universitaria y centro del estero con concentraciones que fluctuaron aproximadamente entre 200 000 ufc/ml y 300 000 ufc/ml, siendo estas las áreas más afectadas por la contaminación fecal y *Escherichia coli*.

Las variaciones durante 24 meses en 12 estaciones se investigó en el estuario interior del Golfo de Guayaquil desde la Isla Santay en el río Guayas hasta la Isla Puná y el Estero

Salado, para el análisis recolectaron una totalidad de 288 muestras determinando la presencia de coliformes totales, fecales y *E. coli* Tipo I (enteropatógenos) predominaron el 100% de estas bacterias en el canal de entrada de las Esclusas y el canal de Matorrillo, que son los sitios que reciben la mayor descarga de agua doméstica de Guayaquil. Pin *et al.* (1998).

Estudios microbiológicos realizados en el Estero Puerto Hondo por Larreátegui. (2003), y Cuenca *et al.* (2006), encontraron Coliformes totales con un rango de 115 - 256 ufc/ml en muestras de agua y 35 - 45 ufc/g en moluscos (*Ostrea*), indicando que esta área no tiene un alto grado de contaminación microbiológica.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Área de Estudio

Los manglares de Puerto Hondo forman parte del estuario del río Guayas comprendido desde el km 15 hasta el km 20 vías a la Costa, constituyendo parte de la zona de amortiguamiento del Bosque Protector Cerro Blanco y la Reserva Faunística Manglares el Salado.

El Estero Puerto Hondo se caracteriza por árboles de manglar como: Mangle rojo (*Rhizophora mangle*, *Rhizophora harisonii*), Mangle blanco (*Laguncularia racemosa*), Mangle negro (*Avicennia germinans*), Mangle jolí o mangle botón (*Conocarpus erectus*), así como plantas típicas de ambientes salinos (*Batis marítima*) y epifitas de manglar (bromelias, orquídeas). El estero principal posee ramales y subramales donde se realizan actividades pesqueras. (Estrella, 2000).

El Estero Puerto Hondo, es parte de un ramal del Estero Salado, rodeada de un ecosistema de manglar, este tiene una entrada en el Golfo de Guayaquil desde el Océano Pacífico y sigue al norte hacia Guayaquil. El Estero Puerto Hondo avanza hacia el oeste alcanzando hasta el Km. 20 vía a la costa (a más de 60 Km. del mar). (Cuenca *et al.*, 2006).

El área de estudio está localizada entre las coordenadas 2°11'24" - 2°13'01" de latitud sur y entre 80°00'45" - 79°58'02" de longitud Oeste y a 4 m. sobre el nivel del mar, dentro de esta área se encuentra la población de Puerto Hondo que tiene una superficie de 25 hectáreas en su parte urbanizada (Figura 1).

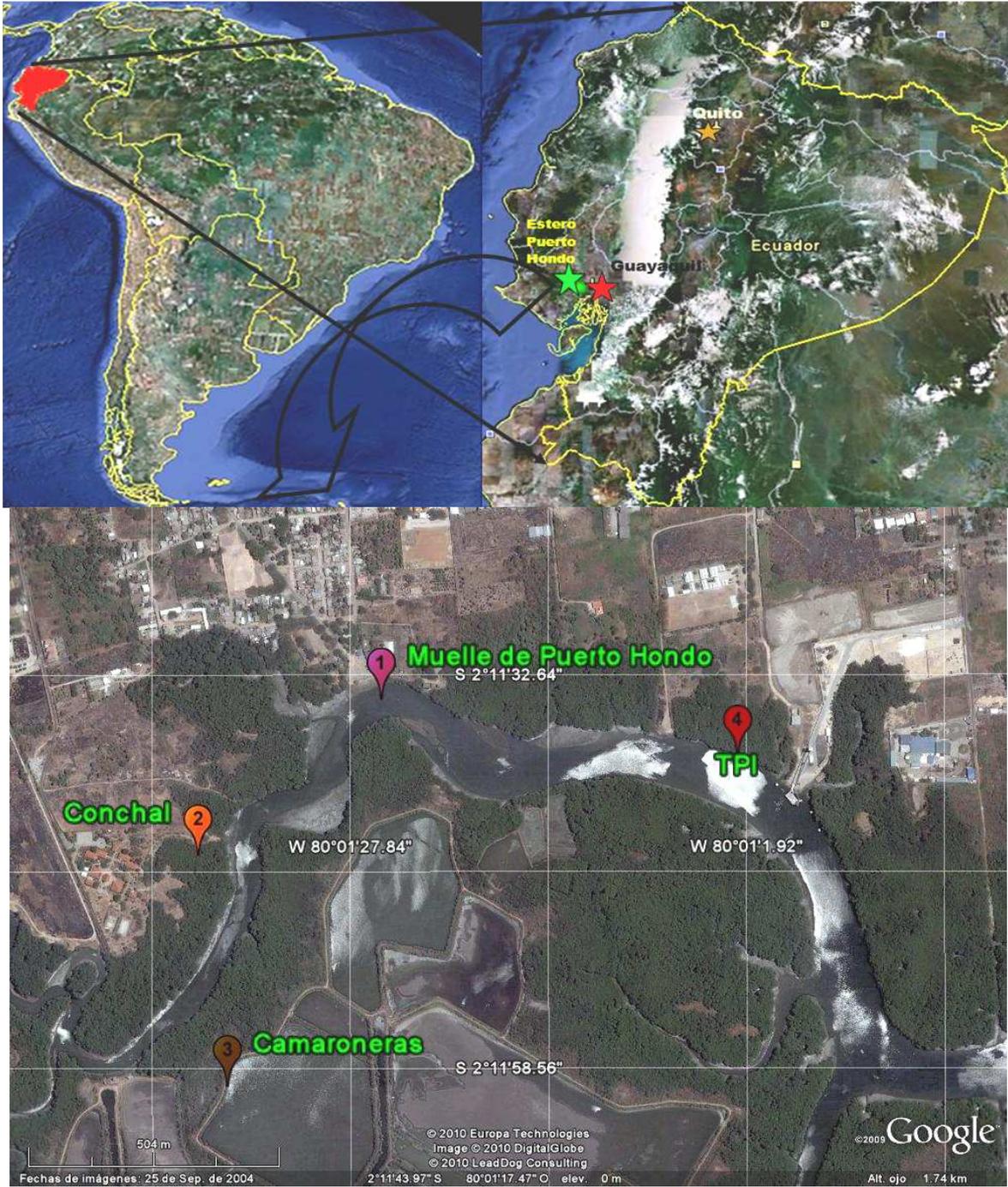


Figura 1. Imágenes de la ubicación del área, Google 2004. Tomadas el 05 de septiembre del 2009.

Tabla1. Estaciones de muestreo y coordenadas del área de estudio.

Estaciones	Lugares	Coordenadas
1	Muelle de Puerto Hondo	S 02°11'34.2'' WO 80°01'25.8''
2	Conchal (Extracción de mejillones y ostiones)	S 02°11'44.5'' WO 80°01'37.8''
3	Camaronera	S 02°11'59.7'' WO 80°01'35.9''
4	Terminal Portuaria Internacional Pto. Hondo(TPI)	S 02°11'38.0'' WO 80°01'02.5''

Para realizar los muestreos se establecieron 4 estaciones ubicadas a lo largo del estero Puerto Hondo. (Tabla.1 y Figuras 2 – 5 en apéndice)

3.2. Fase de Campo:

3.2.1. Colección de las muestras

Las muestras se recolectaron cada 15 días en bajamar, durante la estación seca en los meses de septiembre y octubre del 2009, se recolectaron 20 organismos de cada familia (*Ostrea* y *Mytella*). La recolección de *Ostrea* se realizó mediante el método descrito por Miecser J.(1992) utilizando cuchillas o navaja para desprender el organismo vivo de las raíces del mangle, mientras que especies del genero *Mytella* fueron recolectadas escarbando el sedimento (Figura. 6,7) todos los bivalvos fueron colocados en fundas plásticas con cierre hermético, rotuladas y transportadas en refrigeración (8 -10°C), al laboratorio de Microbiología del Instituto de Investigaciones de Recursos Naturales (IIRN) de la Facultad de Ciencias Naturales donde fueron procesadas de inmediato.



Figura 6. Recolección de *Ostrea columbiensis* de las raíces de *Rizophora mangle*, durante los meses de septiembre – octubre, 2009



Figura 7. Recolección de *Mytella guyanensis* del sustrato arenoso – fangoso durante los meses de septiembre - octubre, 2009

En cada estación se determinó *in situ* la temperatura superficial del agua con un termómetro de mercurio graduado de -10 a 250 °, y la salinidad con el refractómetro marca Atago graduado de 0 -100 ‰. Se recolectaron muestras de agua en botellas de polietileno de 250 ml, para determinar pH, las cuales fueron trasladadas de inmediato en una hielera al laboratorio de Espectrofotometría de Absorción Atómica del (IIRN); (Figura 8 en apéndice).

Se tomaron muestras de agua para análisis químicos: Oxígeno disuelto (OD), en botellas de 300 ml transparentes, el contenido de oxígeno fue fijado siguiendo el método descrito por Winkler modificado por Carpenter (1965) adicionando 1ml de Sulfato manganoso y 1ml de Ioduro alcalino; para la Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO₅) se utilizó las botellas de DBO oscuras. Siguiendo el protocolo establecido en el Standard Methods for the examination of water & wastewater, (2005).

Estas muestras fueron recolectadas mensualmente en los meses de septiembre y octubre, preservadas y llevadas de inmediato al Laboratorio del Instituto Nacional de Pesca (INP) para su análisis.

3.3. Fase de Laboratorio

Previo a los análisis se procedió a realizar varios lavados en la parte externa de los organismos con solución salina estéril al 0.85% , para posteriormente sembrar aguas del lavado de la 5^{ta} y 6^{ta} en el medio de cultivo Tryptic Soy Agar (TSA) , determinando que en el sexto lavado ya no hubo crecimiento de bacterias.(Figura 9 en apéndice).

La identificación taxonómica de los bivalvos utilizó la clasificación de Keen. (1971) (Tabla. 2).

Tabla 2. Características del medio y distribución de *Ostrea columbiensis* y *Mytella guyanensis*

FAMILIA	NOMBRE CIENTÍFICO	NOMBRE COMÚN	CARACTERÍSTICAS
Mytilidae	<i>Mytella guyanensis</i> (Lamarck 1819)	Mejillón	Viven en ecosistema demanglar, adheridos a pilotes de cemento, raíces de mangle o enterrados en un sustrato areno-fangoso, la parte interior de la concha es café lustroso, su talla media es de 45mm de longitud total, Se distribuye desde México hasta Puerto Bolívar en Ecuador.
Ostreidae	<i>Ostrea columbiensis</i>	Ostión	Vive en ecosistemas de manglar, adherida a las raíces aéreas de los arboles de mangle especialmente los de mangle rojo <i>Rhizophoramangle</i> , su talla media es de 53mm de altura, tiene forma triangular, trapezoidal, frágil y rugosa. Se distribuye des de Bahía de san Bartolomé, en México hasta Chile.

Se seleccionaron 10 organismos de *Ostrea columbiensis* y *Mytella guyanensis* luego se procedió a medir la longitud total de *Ostrea* y *Mytella* las cuales fueron medidas con un Vernier o Pie de rey Marca Mitutoyo, calibrado por el INEN bajo la Norma NTE INEN- ISO/IEC 17025:2005, marca VWR Staiules Hardened (Figuras. 10, 11).



Figura 10 *Ostrea columbiensis* 59.40 mm



Figura 11. *Mytella guyanensis* 34.40 mm

Se procedió a abrir los 10 organismos de mejillones y 10 de ostiones bajo condiciones asépticas, se extrajo la carne y sus líquidos de cada organismo por separado macerándolas;

se peso 10g de cada muestra colocándolas en Bakers estériles, adicionando 45ml de solución salina al 0,85% y se homogeneizó las muestra durante 2 minutos. Siguiendo las especificaciones descritas por Wallace y Col (1995).

La determinación de Coliformes totales y *Escherichia coli* se utilizó la técnica de Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico (1994); realizando hasta la dilución 10^{-3} , inoculando 1.0ml de cada una de las diluciones por duplicado en cajas petri mediante una micropipeta estéril y calibrada, a continuación se adicionó de 18.0 a 20.0 ml de medio de cultivo CHROMOCULT(SM. 9223, EPA 2002), fundido y mantenido a $45 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$, se mezcló cuidadosamente el inóculo con el medio, mediante seis movimientos de derecha a izquierda, seis movimientos en el sentido de las manecillas del reloj, seis movimientos en el sentido contrario al de las manecillas del reloj y seis de atrás para adelante, sobre la superficie lisa de la cámara de flujo laminar, permitiendo que la mezcla se solidifique (Figura.12 en apéndice).

Las cajas fueron incubadas en forma invertida conjunto con la caja control a $35 - 37^{\circ}\text{C}$ durante 24- 48 horas (Figuras. 13,14 en apéndice)

Posteriormente se determinaron colonias de color rojo como Coliformes totales y las de color violeta como *Escherichia coli* a las cuales se les realizó las pruebas bioquímicas básicas como tinción de Gram y pruebas de oxidasa. (Tabla 3)

Tabla 3. Características bioquímicas de Coliformes totales y *E.coli*

Pruebas bioquímicas básicas		
Prueba	Coliformes totales	<i>E.coli</i>
Tinción de Gram	Bacterias Gram negativas	Bacterias Gram negativas
Oxidasa	Positiva	Negativa

Después se procedió al conteo de las colonias bacterianas expresándolas en ufc/g. La misma que se realizó con el contador de colonias marca Sienceware. (Figura.15 en apéndice).

Para la confirmación de *E.coli* se realizó la prueba de indol que consistió en agregar una gota del reactivo Kovac a la colonia la misma que dió positiva por el cambio de color violeta a rojo (Figura 16).

3.4. Análisis Estadístico

Los análisis estadísticos utilizó ANOVA de dos Vías para determinar diferencias entre los distintos sitios y conteos bacterianos (Prueba de Tukey). El programa estadístico utilizado fue el Análisis Estadístico (SAS) Versión 9.1.3. Asumiendo un valor de $P < 0.05$ a ser estadísticamente significativo.

4. RESULTADOS

La longitud de los organismos colectados estuvo en el rango de 57.30 - 59.50 mm y 32.20 -34.3 mm, la longitud promedio fue de 59.4 mm (*Ostrea columbiensis*) y 34.4 mm (*Mytella guyanensis*).

De los resultados obtenidos en los análisis microbiológicos se determinó que todas las muestras de (*Mytella guyanensis*, *Ostrea columbiensis*) presentaron Coliformes totales con una concentración que varió en un amplio rango, desde 25 hasta 815 UFC/g.

Durante los cuatro muestreos la concentración de coliformes totales en la especie *Mytella* fue > 300 UFC/g, los niveles más altos de coliformes totales (815 UFC/g) presentó la estación 3 (Figura. 17).

La bioacumulación de coliformes totales en *Ostrea columbiensis*, fueron < 100 UFC/g. (Figuras.18).

Las concentraciones de *E. coli* fueron < 100 UFC/g en todas las muestras de *Mytella guyanensis* excepto la estación 4 que presentó mayor concentración durante el último muestreo (Figura.19).

Durante el período de estudio la bacteria *E. coli* estuvo presente en todas las muestras de *Mytella guyanensis*, mientras que en la especie *Ostrea columbiensis* no se pudo detectar su presencia en ninguna de las 4 estaciones muestreadas.

En la tabla. 4 se muestran los niveles de coliformes totales y *E.coli* en *Mytella guyanensis*, y *Ostrea columbiensis* en las cuatro estaciones muestreadas.

Tabla 4. Niveles de Coliformes totales y *E. coli* en *Mytella guyanensis* y *Ostrea columbiensis*

Muestreo	Muelle PH				Conchal				Camaronera				TPI			
	<i>Mytella guyanensis</i>		<i>Ostrea columbiensis</i>		<i>Mytella guyanensis</i>		<i>Ostrea columbiensis</i>		<i>Mytella guyanensis</i>		<i>Ostrea columbiensis</i>		<i>Mytella guyanensis</i>		<i>Ostrea columbiensis</i>	
	Ct : UFC/g	<i>E.c</i> : UFC/g	Ct : UFC/g	<i>E.c</i> : UFC/g	Ct : UFC/g	<i>E.c</i> : UFC/g	Ct : UFC/g	<i>E.c</i> : UFC/g	Ct : UFC/g	<i>E.c</i> : UFC/g	Ct : UFC/g	<i>E.c</i> : UFC/g	Ct: UFC/g	<i>E.c</i> : UFC/g	Ct : UFC/g	<i>E.c</i> .: UFC/g
Sep-01	350	50	45	Ausencia	400	50	40	Ausencia	60	30	20	Ausencia	440	25	20	Ausencia
Sep-15	320	50	60	Ausencia	485	60	30	Ausencia	815	70	20	Ausencia	340	85	30	Ausencia
Sep-29	320	45	45	Ausencia	315	35	35	Ausencia	405	20	40	Ausencia	315	20	25	Ausencia
Oct-26	600	85	85	Ausencia	350	35	50	Ausencia	250	35	40	Ausencia	600	350	40	Ausencia

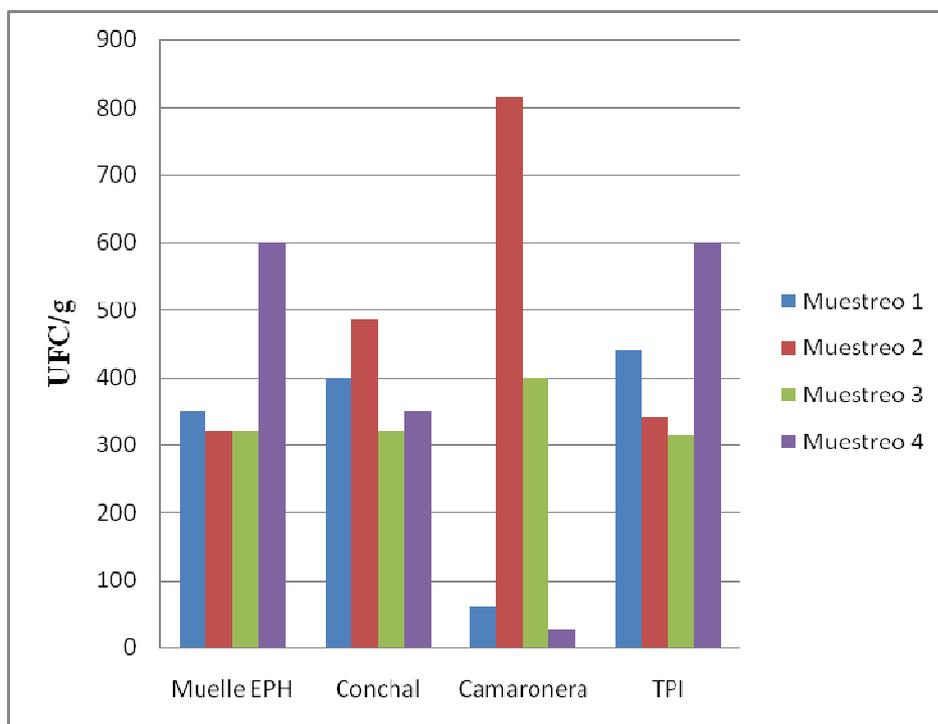


Figura 17. Niveles de Coliformes totales en *Mytella guyanensis*, septiembre - octubre 2009.

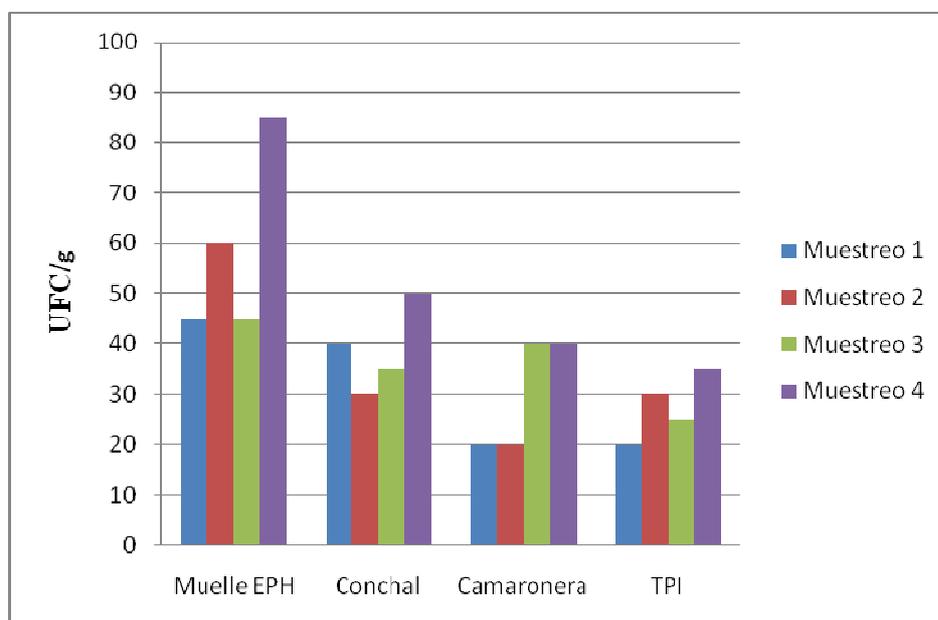


Figura 18. Niveles de Coliformes totales en *Ostrea columbiensis*, septiembre - octubre 2009

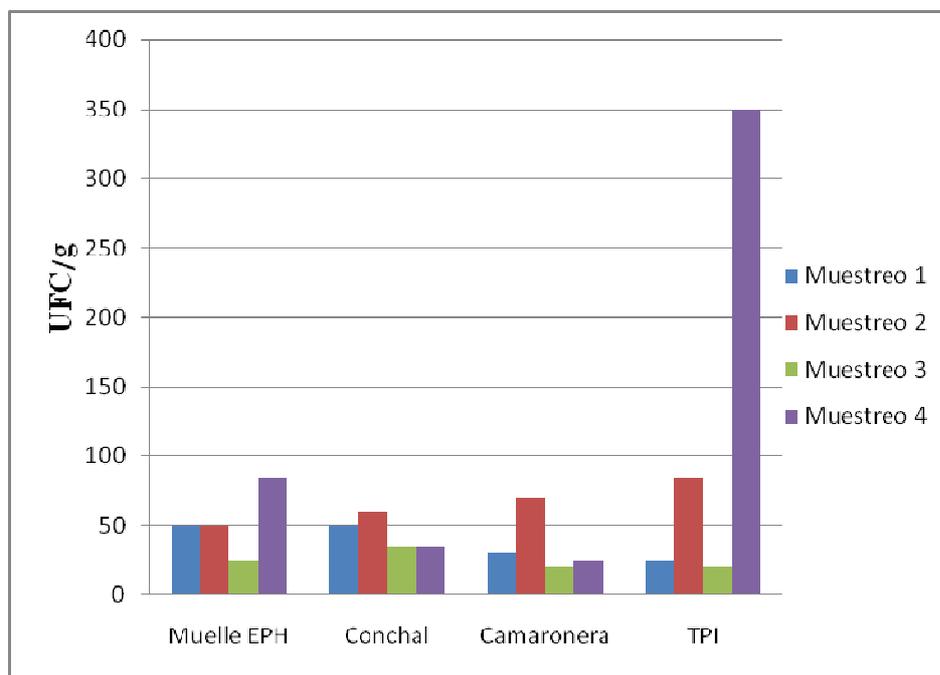


Figura 19. Niveles de *E.coli* en *Mytella guyanensis*, septiembre - octubre 2009.

En el modelo ajustado para los distintos sitios de muestreo se encontró que los contajes de Coliformes totales en *Ostrea columbiensis* y *Mytella guyanensis* presentaron diferencia significativa ($P < 0.05$), en cada sitio de muestreo (Tabla 5 y tabla 6 en apéndice).

Los contajes de *E. coli* en *Mytella guyanensis* presentaron diferencia significativa ($P < 0.05$), en cada uno de los sitios de muestreo, sin embargo en la estación 4 (TPI) se presentó la mayor concentración bacteriana.(Tabla 7 y tabla 8 en apéndice).

En *Ostrea columbiensis* las medias de los conteos bacterianos (Coliformes totales) fueron menores en la estación 4 comparados con las estaciones 1, 2 y 3 (Tabla 9 y 10 en apéndice).

En todas las muestras de *Ostrea columbiensis* no hubo presencia de *E.coli* por lo que no se pudo realizar el análisis estadístico.

Tabla 5. Análisis estadísticos de Coliformes totales en *Mytella guyanensis*, septiembre – octubre, 2009

The SAS System 20:32 Sunday, February 14, 2010 8

The GLM Procedure
Least Squares Means

Muestreo*Sitio Effect Sliced by Sitio for Conteos

Sitio	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Camarone	3	2.994637	0.998212	623.88	<.0001
Conchal	3	0.037250	0.012417	7.76	0.0020
Muellede	3	0.104137	0.034712	21.70	<.0001
TPI	3	0.096550	0.032183	20.11	<.0001

Tabla 7. Análisis estadísticos de *E.coli* en *Mytella guyanensis*, septiembre - octubre. 2009.

The SAS System 23:00 Sunday, February 14, 2010 8

The GLM Procedure
Least Squares Means

Muestreo*Sitio Effect Sliced by Sitio for Conteos

Sitio	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Camarone	3	0.314550	0.104850	26.34	<.0001
Conchal	3	0.086400	0.028800	7.23	0.0028
Muellede	3	0.289838	0.096613	24.27	<.0001
TPI	3	1.961638	0.653879	164.24	<.0001

Tabla 9. Análisis estadísticos de Coliformes totales en *Ostrea columbiensis*, septiembre – octubre, 2009

The GLM Procedure
Least Squares Means

Muestreo*Sitio Effect Sliced by Sitio for Conteos

Sitio	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Camarone	3	0.180000	0.060000	22.94	<.0001
Conchal	3	0.052800	0.017600	6.73	0.0038
Muellede	3	0.103037	0.034346	13.13	0.0001
TPI	3	0.022950	0.007650	2.92	0.0658

Los parámetros físico-químicos son una medida de la calidad del agua que se está monitoreando. En esta investigación se registraron medidas de cinco variantes físico químicas como la concentración de oxígeno disuelto (mg/l), Demanda Biológica de Oxígeno, temperatura (°C), salinidad y pH. Estos datos se recolectaron con el propósito de correlacionar la presencia de coliformes totales y para obtener una idea general del ambiente donde se cosechan estos bivalvos. Los valores de las variantes registrados de cada estación se encuentran en las (Figuras 20 – 23 y Tablas 11- 12, en apéndice)

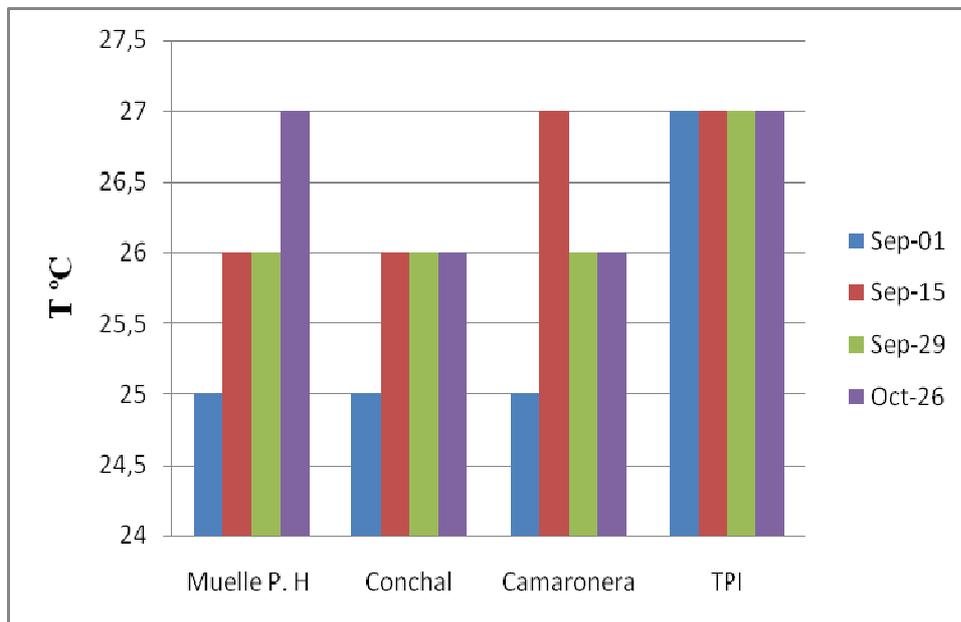


Figura 20. Rangos de temperatura, septiembre - octubre del 2009.

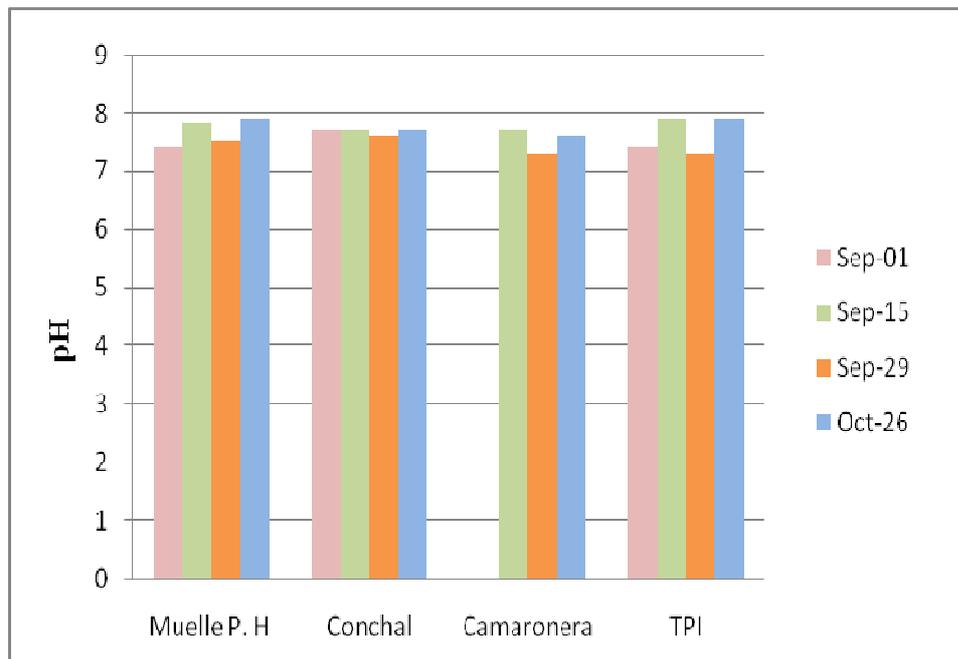


Figura 21. Rangos de pH, septiembre - octubre del 2009.

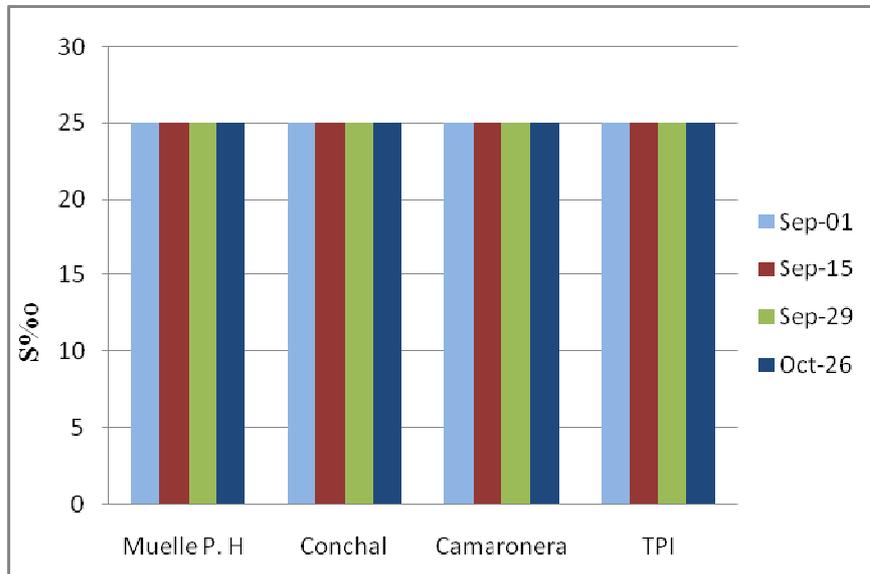


Figura 22. Rango de salinidad, septiembre - octubre del 2009.

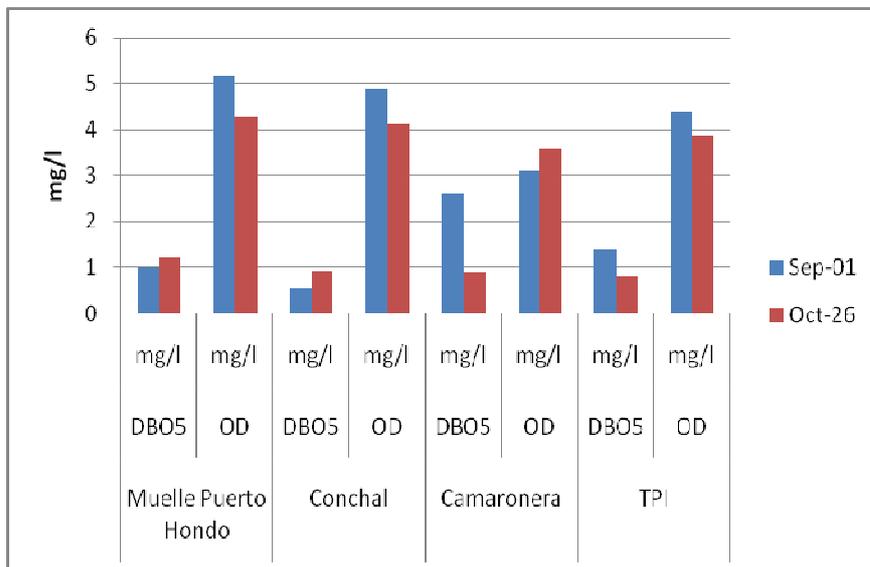


Figura 23. Rangos de Oxígeno Disuelto y Demanda Biológica de Oxígeno, septiembre - octubre del 2009

5. DISCUSIÓN

Las aguas residuales contaminadas son una fuente potencial de amenaza epidémica debido a la presencia de bacterias causantes de enfermedades. El estero Puerto Hondo recibe aguas servidas de fuentes puntuales, la descarga más evidente es una tubería ubicada cerca de la estación 1 de donde provendrían las aportaciones de bacterias fecales que afectan la calidad del agua de este estero. El estudio fue realizado durante la época seca por lo que los aportes de Coliformes totales y *E coli* a las aguas del estero y los organismos que lo habitan provienen de las aguas urbanas no tratadas de las poblaciones cercanas y no de las escorrentías de las aguas lluvias.

La investigación se enfocó en cuatro lugares del estero que son influenciados por las actividades humanas que se desarrollan en sus alrededores.

Todos los organismos colectados en los cuatro sitios muestreados presentaron acumulación de coliformes totales y *E coli*, estos resultados concuerdan con los hallazgos de Larreàtegui (2003) y Cuenca *et al.* (2006) quienes determinaron la presencia de estas bacterias en muestras de agua y organismos de la especie *Ostrea*.

Fue muy notoria la diferencia en los patrones de acumulación de los contaminantes microbianos en las especies estudiadas. *Mytella* demostró la mayor tendencia a la acumulación de Coliformes totales presentando niveles de acumulación de 7 a 15 veces más que en *Ostrea*. *E.coli* presentó similar comportamiento estando presente en *Mytella* y no detectada en *Ostrea*, Olafsen *et al.* (1993) explica patrones de acumulación de ciertos bivalvos considerando los hábitats en que estos se desarrollan, así algunos viven enterrados en los sedimentos (*Mytella*) donde están expuestos a altas densidades de bacterias en su hábitat natural, mientras que otros viven adheridos a las raíces del mangle (*Ostrea*) u otro sustrato donde están expuestos a un ambiente relativamente más limpio.

La acumulación de bacterias indicadoras y virus en los sedimentos ha sido bien documentada, los sedimentos pueden contener de 100 a 1000 veces más bacterias indicadoras fecales que las aguas sobre ellos (Hood y Ness, 1982; Davies *et al.* 1995; Roslev *et al.* 2008). Los organismos que viven en contacto con los sedimentos como *Mytella*, están más expuestos a la acumulación de bacterias fecales.

No es necesario que haya un elevado nivel de *E.coli* para que sea un indicativo de contaminación fecal reciente o tardía, ya que la sobrevivencia de los coliformes en aguas marinas puede sobrepasar los 5 días después de las descargas (Chai, 1983 FDA, 1991; *vide* Villalobos *et al.*, 1998). La relación encontrada entre los sitios muestreados y los niveles de Coliformes totales en *Mytella* y *Ostrea*, indica que toda el área de estudio está influenciada por las descargas de aguas residuales provenientes de las poblaciones cercanas y actividades humanas que se desarrollan en el área.

Durante el último muestreo, en la estación 4 se encontró la mayor concentración de *E.coli*, (más del 50% del contaje de Coliformes totales correspondió a esta bacteria), esto podría ser el resultado de las descargas directas de aguas residuales provenientes de las embarcaciones que frecuentan este Terminal Portuario así como de las poblaciones de este sector.

Se pudo observar cierta relación entre el contenido de Coliformes totales y *E. coli* en los organismos estudiados con la temperatura, las concentraciones de estas bacterias fueron mayores en las estaciones que registraron temperatura de 27 °C (segundo muestreo del mes de septiembre, y en la estación 4 en el cuarto muestreo del mes de octubre), lo que concuerda con los estudios realizados por Solic *et al.* (1999) y Collin *et al.* (2008), sobre los efectos de la temperatura y la concentración de los Coliformes fecales en agua de mar sobre el índice de concentración en mejillones y ostras indican que las concentraciones de coliformes fecales aumento con el cambio de temperatura máximo de 24°C.

Desde el punto de vista de salud pública, es reconocido internacionalmente que los moluscos bivalvos concentran contaminantes de la columna de agua en que se desarrollan pudiendo causar enfermedades a los consumidores. Para reducir este riesgo ciertos países, como la Unión Europea, han establecido regulaciones que fijan normas sanitarias para la producción y comercialización de estos organismos (Directiva 91/492/CEE).

Según las “Normas Sanitarias de Alimentos” de la Organización Panamericana de la Salud (1967), para su consumo, los moluscos bivalvos deben estar libres de microorganismos patógenos, mientras que el máximo permitido por la Administración de Drogas y alimentos de los Estados Unidos FDA (1990b), es < 23 UFC/g de bacterias Coliformes totales, en este estudio el 100% de las muestras de *Mytella* analizadas contenían Coliformes totales y *E.coli*, mientras que *Ostrea* no presentó *E. coli* haciéndolas inadecuadas para el consumo humano si se consumen crudos o semicrudos.

Las áreas de donde los bivalvos son cosechados, deben ser clasificadas de acuerdo a un estándar microbiológico, de acuerdo a (Laing and Spencer, 2006), estas áreas se clasifican en Grado A (no mayor de 230 NMP *E. coli*/100g), B (no mayor del límite de 5 tubos de 3 diluciones del ensayo NMP de 4600 *E. coli* /100g) y C (no mayor del límite de 5 tubos de 3 diluciones del ensayo NMP de 46000 *E. coli* /100g) así los organismos colectados en Puerto Hondo necesitarían depuración (Grado B), previo a su comercialización, ésta práctica es muy eficiente en la eliminación de muchas bacterias fecales pero menos efectiva en la remoción de virus e ineficiente para contaminantes como ciertos vibrios, biotoxinas, metales pesados y químicos orgánicos (FAO, 2008) o ser reubicadas (Grado C) por algunos meses en áreas de clasificación A o B hasta alcanzar un estándar bacteriológico aceptable antes de su comercialización.

Los valores de Oxígeno Disuelto detectados en el Estero puerto Hondo fueron mayores a 2.5 mg/l. lo que indica que este no es un factor estresante para la vida acuática de acuerdo a los estudios realizados por Kelanina (1953; *fide* Estrella, 2000), quien determina como tóxicos los valores inferiores a 2.5 mg/l. Considerando que el Oxígeno

Disuelto es el parámetro indicativo de la gran actividad bacteriana en la degradación de la materia orgánica en la zona, los valores de DBO₅ muestran que las concentraciones de material biodegradable no son altas.

Mytella y *Ostrea* así como otras especies de bivalvos pueden ser empleadas como bioindicadores de contaminación microbiana así *Mytella guyanensis* demostró ser eficiente para acumular Coliformes totales y *E. coli*, mientras que *Ostrea columbiensis* fue eficiente acumulando Coliformes totales siendo un punto importante de consideración el hábitat en que se desarrollan.

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

“Las especies *Mytella* y *Ostrea* son bioindicadoras de contaminación microbiana debido a que en este estudio se ha demostrado que acumulan microorganismos bacterianos provenientes de aguas residuales no tratadas”

Todas las muestras analizadas de *Mytella guyanensis* (160) y *Ostrea columbiensis* (160) colectadas en los cuatro sitios muestreados del estero Puerto Hondo presentaron acumulación de coliformes totales y *E. coli* con un rango de 25 -815 UFC/g. y de 20 -350 UFC/g respectivamente.

Los niveles de coliformes totales fueron entre 7 y 15 veces más abundantes en *Mytella* que en *Ostrea*.

Los niveles mas altos de *E.coli* (350 UFC/g) fueron en la estación 4 (TPI)

Desde el punto de vista sanitario *Mytella* y *Ostrea* extraídos del estero Puerto Hondo no son aptas para el consumo humano directo por su elevado nivel de coliformes totales y *E.coli*.

La relación encontrada entre los sitios muestreados y los niveles de Coliformes totales en *Mytella* y *Ostrea*, indica que toda el área de estudio está contaminada por las descargas de aguas residuales provenientes de las poblaciones cercanas.

En este estudio se pudo evidenciar que las concentraciones de coliformes totales y *E.coli* fueron mayores en las estaciones 3 y 4 que registraron temperaturas de 27 °C

Se recomienda a las personas consumidoras de mejillones y ostiones que deben llevar a cocción estos organismos antes de ingerirlos.

Se recomienda “someter las aguas residuales domesticas a algún tipo de tratamiento para disminuir su carga de contaminantes microbiológicos antes de ser descargadas en el Estero Salado.”

Realizar tratamientos de depuración al los Moluscos Bivalvos vivos manteniéndolos en agua de mar limpia durante un determinado período de tiempo para reducir la concentración de microorganismos y hacerlos aptos para el consumo humano directo.

7. ABREVIATURAS UTILIZADAS

mg/l: Miligramos por litro

ml: Mililitros

l: litros

°C: Grados centígrados

pH: Potencial de hidrógeno

NMP: Número más probable

UFC/g: Unidades Formadoras de Colonias por gramos

BAM: Manual Analítico Bacteriológico

EPA: Environmental Protection Agency

FDA: Food and Drugs Administration

ICMSF: Comisión Internacional sobre Especificaciones Microbiológicas de Alimentos.

G: Gramos

sp: Especie

NSSP: National Shellfish Sanitation Program

%: Porcentaje

TPI: Terminal Portuaria Internacional

P.H: Puerto Hondo

IIRN: Instituto de Investigaciones de Recursos Naturales

OD: Oxígeno Disuelto

DBO₅: la Demanda Bioquímica de Oxígeno

INP: Instituto Nacional de Pesca

et.al: entre otros

TSA: Tryptic Soy Agar

INEN: Instituto Ecuatoriano de Normalización

E. Escherichia

SAS: Software de Análisis Estadístico

P: Probabilidad

GLM: Modelo Lineal General

HO: Hipótesis Nula

8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

1. Carpenter, J. (1965): The accuracy of the Winkler method for dissolved oxygen analysis. *Limnol. And Oceanog.* 10: 135 – 140 pp
2. Collin, B., Rehnstam-Holm A., and Hernroth, B. 2008. Faecal Contaminants in Edible Bivalves from Maputo Bay, Mozambique: Seasonal Distribution, Pathogenesis and Antibiotic Resistance. *University, Guldhedsgatan. The Open Nutrition Journal* 2: 86-93 PP
3. Cortés-Lara, M. 2003. Importancia de los coliformes fecales como indicadores de contaminación en la Franja Litoral de Bahía de Banderas, Jalisco-Nayarit. *Rev. Biomed.* 121-123.pp
4. Cuenca, J., Arcos, V., Arroyo, M., Torres, G., Siguencia, R., Mero, M., Campos, J., Lavayen, Y. y Machuca, M. 2006. Determinación de agentes contaminantes por acción antropogénica en comunidades del plancton y macro bentos en el Estero Puerto Hondo. Instituto de Investigaciones de Recursos Naturales. Universidad de Guayaquil. Informe Interno. 38. PP.
5. Croci, L. Losio N, Suffredini, E and, Pavoni E, 2006. Assessment of human enteric viruses in shellfish from the northern Adriatic. Instituto Zooprofilattico Sperimentale, Roma, Italy.257. Pp
6. Davies Cheryl, Julian A. Long, Margaret Donald and Nicholas J. Ashbolt. (1995). Survival of fecal microorganisms in marine and freshwater sediments. *Applied and environmental microbiology.* p. 1888 – 1896.
7. Diario Oficial de la Unión Europea. REGLAMENTO (CE) No 2073/2005 DE LA COMISIÓN de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios
8. Directiva del Consejo, 1991 Normas Sanitarias aplicables a la producción y puesta en el mercado de moluscos bivalvos vivos (91/492/CEE).
9. Estrella, T. 2000. Usos del recurso agua y manglares en el Estero Puerto Hondo, Provincia del Guayas, Ecuador. Disertación de Tesis: Maestría en Conservación y Gestión del medio natural: Integración de sistemas naturales y Humanos (1999).Universidad Internacional de Andalucía. Sede Iberoamericana de La Rábida. Huelva-España. Pp. 119

10. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 1990b. Sanitación of shellfish growing áreas. Nacional Shellfish sanitatiòn program. Manual of operations parte. I.U.S. Dept of health and human services. Washington. D. C U. S.A.
11. Fontáñez, B. 2005, Determinación del perfil Microbiológico de la almeja (*Lucina pectinata* Gmelin, 1791), del ostión de mangle *Crassostrea rhizophorae* Guilding, 1828) y las aguas de extracción de bivalvos de la zona Suroeste de Puerto Rico. Universidad de Puerto Rico.pp 83.
12. Garay, J.A., Marín, B., Ramírez, G., Bentacourt, J., Troncoso, W., Gómez, M.2002. Diagnóstico y evaluación de la calidad ambiental marina en el Caribe y Pacífico.
13. Hood Mary A. and Gregory E. Ness (1982). Survival of *Vibrio cholera* and *Escherichia coli* in estuarine waters and sediments. Applied and environmental microbiology. p. 578 – 584.
14. Jiménez, R.1998.Plan integral para recuperación del Estero Salado: Aspectos Biológicos. Informe Privado. Pp. 42
15. Keen, Myra, Sea Shells of Tropical West. America, Marine Mollusca from Baja California to Peru 1971, Second Edition Stanforrd University Press, Stanford, California Pp 1064.
16. Kelanina, E. M (1953). Mentioned por Jame Hoff (W.P.C.F. Vol. 29 pp: 267 - 277).Safe and critical concentrations of oxygen for young of black sea fishes. Bio.
17. Laing, I. and B.E. Spencer, (2006) Bivalve cultivation: Criteria for selecting a site. Science series Technical Report N° 136.
www.cefas.co.uk/publications/techrep/techrep136.pdf
18. Larreátegui, M. 2003. Análisis bacteriológico y de metales pesados en ostiones capturados en Puerto Hondo. Trabajo de la Cátedra de Metodología de Investigación. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad de Guayaquil. N° 833. Pp. 35.
19. Lovatelli. A; Ababouch L. 2008 Bivalve depuration: fundamental and practical aspects *FAO Fisheries Technical Paper*. No. 511. Rome, FAO. 139p
20. Marín, B., Vivas L.J., Troncoso, W., Acosta, J., Vélez, A., Bentancourt, J. 2004. Diagnóstico y evaluación de la calidad ambiental marina en el Caribe y Pacífico colombiano red de vigilancia para la conservación y protección de las aguas marinas y costeras de Colombia. Diagnóstico Nacional y Regional 2003. INVEMAR.

21. Mormanno ,G. Parisi , A , Addante, N, and Quaglia A. Dambrosio ,C.2005 *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* and microorganisms of fecalorigin in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) sold in the Puglia region (Italy).a Department of Health and Animal Welfare, Faculty of Veterinary Medicine, pp 222.
22. Munn C. 2004. *Marine Microbiology: ecology and applications*. New York: BIOS. Scientific Publisher.
23. Olafsen Jan, Helene Mikkelsen, Hanne Giaever, Geir Hansen (1993). Indigenous bacteria in hemolymph and tissues of marine bivalves at low temperaturas. *Applied and environmental microbiology*. P 1848 – 1854.
24. Organización Panamericana de la Salud. *Normas sanitarias de alimentos*. OPS; 1967.
25. Pin G, García F, Castello M, 1998; Micro flora bacteriana de las aguas del estuario interior del Golfo de Guayaquil; Comportamiento Temporal y Espacial de las Características Físicas, químicas y Biológicas del Golfo de Guayaquil y sus afluentes Daule y Babahoyo entre 1994-1996; INP; pp. 285
26. Quiñones-Ramírez, E., Vásquez-Salinas, C., Pedroche, F., Moreno-Sepúlveda, L., y Rojas-Suárez, O.R. 2000. Presencia de los géneros *Vibrio* y *Salmonella*, y detección de coliformes fecales en almejas del Golfo de México. *Hidrobiológica* 10(2): 131-13
27. Ramos-Ortega, L., Vidal, L., Vilaridy, S., Saavedra, L. 2008. Análisis de la contaminación microbiológica (coliformes totales y fecales en la bahía de Santa Marta, Caribe Colombiano. *Acta biol. Colomb.*, Vol. 13 No. 3, 87 – 98
28. Roslev Peter, Soren Bastholm and Niels Iversen (2008). Relationship between fecal indicators in sediment and recreational waters in a Danish estuary. *Water Air Soil Pollution*.
29. Secretaría de Salud. NOM-110-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico. Norma Oficial Mexicana. México.
30. Solic, M. Krstulovic, S, Jozic, y Curac D 1999 Índice de concentración de Coliformes fecales en crustáceos bajo Diferentes Condiciones Ambientales Instituto de la oceanografía y de las industrias pesqueras, P.O.B. 500, vol. 25, No. 8, págs. 991-1000.
31. *Standard Methodsfor the examination of water & wastewater*, 2005, 21st Edition, Centennial Edition.

32. SM. 9223, EPA 2002
33. Wallece H., Juneg A. 1995 Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. AOAC. Chapter 1, 8ed. Bethesda: AOAC International, 1.01-1.09.
34. Villalobos, L.B. y Elguezabal, A. 1994. Detección de posible *Escherichia coli* enteropatógena en el bivalvo *Pinctada imbricata* comercializado en Cumaná Venezuela. Instituto Universitario de Tecnología de Cumaná. Pp 17.

9. APENDICE



Figura 2. Ubicación Geográfica de la estación 1.



Figura3. Ubicación Geográfica de la estación 2.



Figura 4. Ubicación Geográfica de la estación 3.



Figura 5. Ubicación Geográfica de la estación 4.



Figura 8. Determinación de pH en el laboratorio del IIRN durante los meses de septiembre- octubre. 2009



Figura 9. Lavado de los organismos con solución salina en el Laboratorio del IIRN durante los meses de septiembre- octubre. 2009.

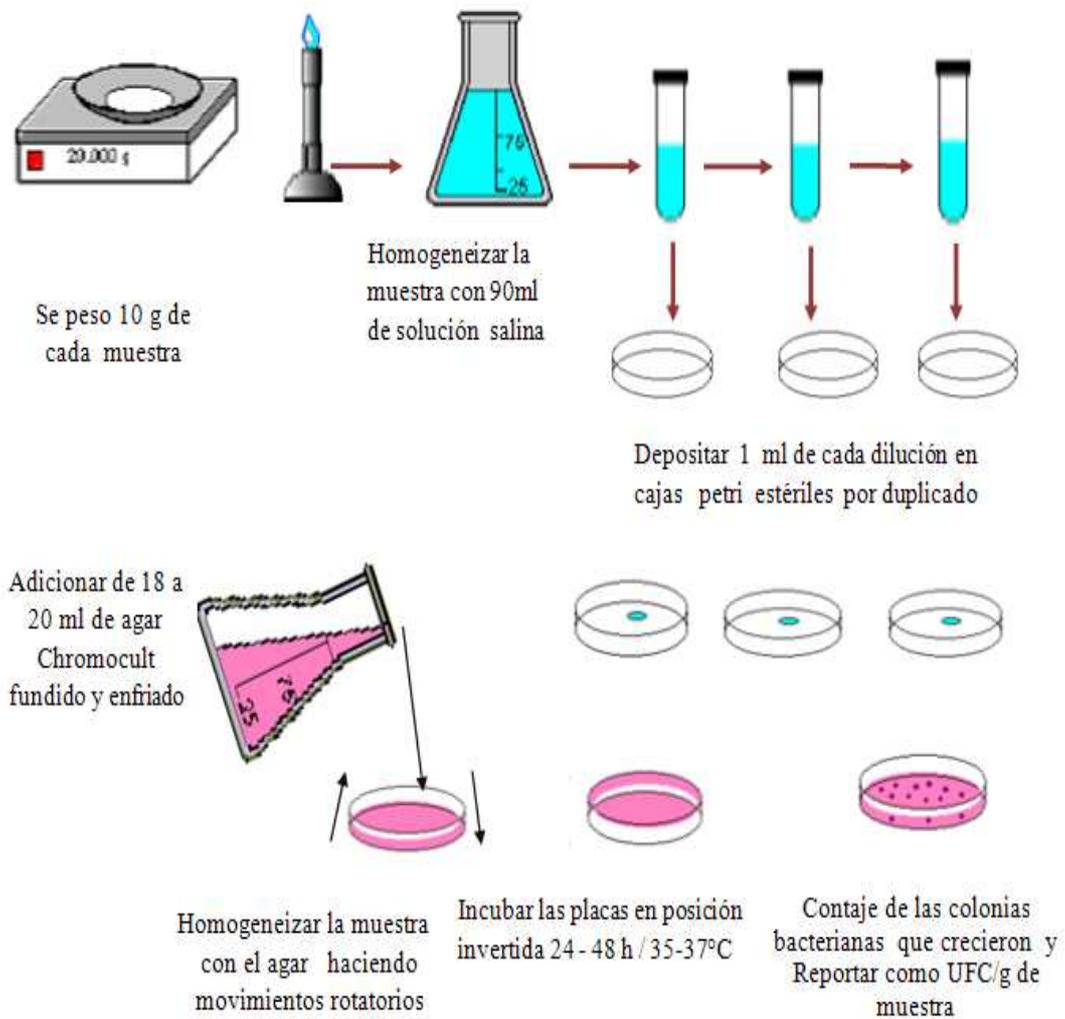


Figura 12. Determinación de coliformes y *E.coli* por cuenta en placa (Tomado de Camacho et al., 2009).



Figura 13. Preparación de diluciones decimales empleando tubos con 9.0 ml de solución salina.



Figura 14. Incubación de las placas a 35-37°C por el lapso de 24 - 48 horas



Figura 15. Contaje de coliformes totales y *E.coli*.

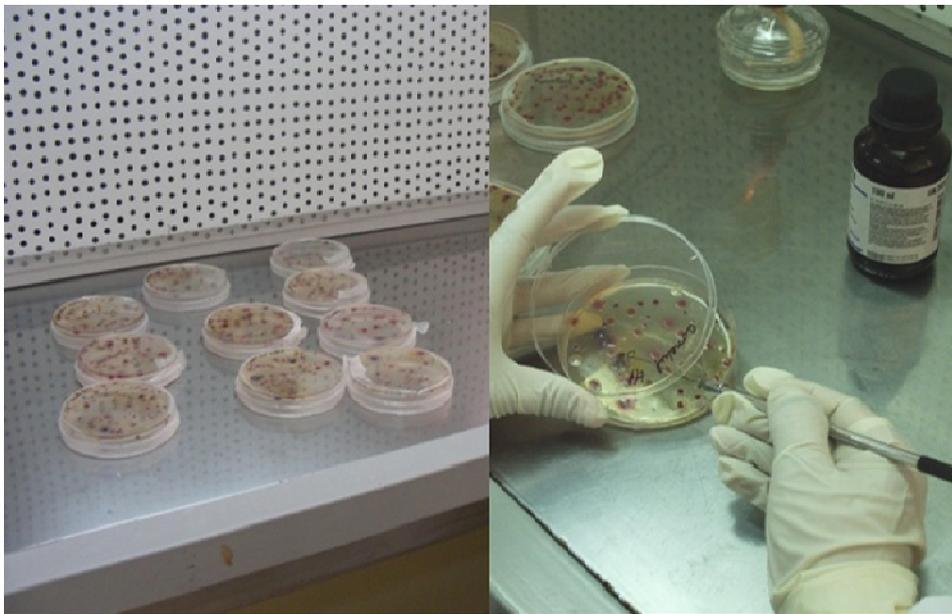


Figura 16. Confirmación de *E. coli* con la prueba de indol usando el reactivo de Kovacs.

**Tabla 6. Modelos para Coliformes totales en Mytella guyanensis
Procedimiento GLM**

Medias de cuadrados mínimos

Ajuste para comparaciones múltiples: Tukey

Sitio	Conteos LSMEAN	Error estándar	Pr > t	Número LSMEAN
Camaronera	2.17125000	0.01414214	<.0001	1
Conchal	2.58250000	0.01414214	<.0001	2
Muelle de P. H	2.58375000	0.01414214	<.0001	3
TPI	2.61250000	0.01414214	<.0001	4

Medias de cuadrados mínimos para el efecto Sitio

Pr > |t| para H0: MediaLS (i)=MediaLSn (j)

Variable dependiente: Conteos

i/j	1	2	3	4
1		<.0001	<.0001	<.0001
2	<.0001		0.9999	0.4603
3	<.0001	0.9999		0.4956
4	<.0001	0.4603	0.4956	

		Conteos
Muestreo	Sitio	LSMEAN
CUATRO	Camaronera	139.000.000
CUATRO	Conchal	254.000.000
CUATRO	Muelle de P.H	278.000.000
CUATRO	TPI	278.000.000
DOS	Camaronera	291.000.000
DOS	Conchal	268.500.000
DOS	le d Muelle de P.H	251.000.000
DOS	TPI	253.000.000
TRES	Camaronera	260.500.000
TRES	Conchal	250.500.000
TRES	Muelle de P.H	250.500.000
TRES	TPI	250.000.000
UNO	Camaronera	178.000.000
UNO	Conchal	260.000.000
UNO	Muelle de P.H	254.000.000
UNO	TPI	264.000.000

Tabla 8. Modelos para *E.coli* en *Mytella guyanensis*

Procedimiento GLM
Medias de cuadrados mínimos
Ajuste para comparaciones múltiples: Tukey

Sitio	Conteos LSMEAN	Error estándar	Pr > t	Número LSMEAN
Camaronera	1.54250000	0.02230821	<.0001	1
Conchal	1.64000000	0.02230821	<.0001	2
Muelle de P.H	1.67875000	0.02230821	<.0001	3
TPI	1.78875000	0.02230821	<.0001	4

Medias de cuadrados mínimos para el efecto Sitio
Pr > |t| para H0: MediaLS (i)=MediaLSn (j)

Variable dependiente: Conteos

i/j	1	2	3	4
1		0.0320	0.0027	<.0001
2	0.0320		0.6187	0.0012
3	0.0027	0.6187		0.0145
4	<.0001	0.0012	0.0145	

Muestreo	Sitio	Conteos LSMEAN
CUATRO	Camaronera	154.000
CUATRO	Conchal	154.000.000
CUATRO	Muelle P. H	92500000
CUATRO	TPI	254.000.000
DOS	Camaronera	185.000.000
DOS	Conchal	178.000.000
DOS	Muelle P. H	170.000.000
DOS	TPI	192.500.000
TRES	Camaronera	130.000.000
TRES	Conchal	154.000.000
TRES	Muelle P. H	139.000.000
TRES	TPI	130.000.000
UNO	Camaronera	148.000.000
UNO	Conchal	170.000.000
UNO	Muelle P. H	170.000.000
UNO	TPI	139.000.000

Tabla 10. Modelos para coliformes totales *en Ostrea columbiensis*

Procedimiento GLM
Medias de cuadrados mínimos
Ajuste para comparaciones múltiples: Tukey

Sitio	Conteos LSMEAN	Error estándar	Pr > t	Número LSMEAN
Camaronera	1.45000000	0.01808185	<.0001	1
Conchal	1.58000000	0.01808185	<.0001	2
Muelle de P.H	1.75125000	0.01808185	<.0001	3
TPI	1.47250000	0.01808185	<.0001	4

Medias de cuadrados mínimos para el efecto Sitio
Pr > |t| para H0: MediaLS (i)=MediaLSn (j)

Variable dependiente Conteos

i/j	1	2	3	4
1		0.0006	<.0001	0.8152
2	0.0006		<.0001	0.0034
3	<.0001	<.0001		<.0001
4	0.8152	0.0034	<.0001	

Muestreo	Sitio	Conteos LSMEAN
CUATRO	Camaronera	160.000.000
CUATRO	Conchal	170.000.000
CUATRO	Muelle de P.H	192.500.000
CUATRO	TPI	154.000.000
DOS	Camaronera	130.000.000
DOS	Conchal	178.000.000
DOS	Muelle de P.H	148.000.000
DOS	TPI	160.000.000
TRES	Camaronera	154.000.000
TRES	Conchal	165.000.000
TRES	Muelle de P.H	139.000.000
TRES	TPI	130.000.000
UNO	Camaronera	130.000.000
UNO	Conchal	160.000.000
UNO	Muelle de P.H	165.000.000
UNO	TPI	14.800.000

Tabla 11.- Parámetros físicos, septiembre - octubre del 2009

PARAMETROS FISICOS												
Muestreos	Estación 1			Estación 2			Estación 3			Estación 4		
	T °C	S%o	pH	T°C	S%o	pH	T°C	S%o	pH	T°C	S%o	pH
Sep 01	25	25	7.4	25	25	7.7	25	25	7.6	27	25	7.4
Sep 15	26	25	7.8	26	25	7.7	27	25	7.7	27	25	7.9
Sep 29	26	25	7.5	26	25	7.6	26	25	7.3	27	25	7.3
Oct 26	27	25	7.9	26	25	7.7	26	25	7.6	27	25	7.9
Promedio	26	25	7.6	26	25	7.6	26	25	7.5	27	25	7.6

Tabla 12.- Parámetros químicos, septiembre - octubre del 2009

Muestreos	PARAMETROS QUIMICOS							
	Estación 1		Estación 2		Estación 3		Estación 4	
	DBO ₅ mg/l	OD mg/l						
Sep 01	1.00	5.15	0.56	4.88	2.60	3.10	1.38	4.37
Oct 26	1.21	4.28	0.91	4.15	0.89	3.55	0.80	3.85
Promedio	1.00	5.00	1.00	5.00	2.00	3.00	1.00	4.00