Depuration System as an alternative for reducing microorganisms in bivalve mollusks from fishing areas in Ecuador

Marynes Montiel[1]; César González[2]; Luís Valdiviezo[3]; Alba L. Navarrete[4]; Nicole Tiscama-Checa[5]; Jorge Silva-Leon[6]; Felix Morales[7]

[1,2,3,4,5,7] Facultad de Ciencias de la Vida, Escuela Superior Politécnica del Litoral, ESPOL, Campus Gustavo Galindo, Km. 30.5 Vía Perimetral, Guayaquil, 090902, Ecuador. *marymont@espol.edu.ec,* cesagonz@espol.edu.ec*, lrvaldiv@espol.edu.ec, allunava@espol.edu.ec, atiscama@espol.edu.ec,* femorale@espol.edu.ec

[6] Facultad de Ingeniería Mecánica y Ciencias de la Producción, Escuela Superior Politécnica del Litoral, ESPOL, Campus Gustavo Galindo, Km. 30.5 Via Perimetral, Guayaquil, 090902, Ecuador. *jfsilva@espol.edu.ec*

Abstract– ***Bivalve mollusks are a product of high nutritional and commercial value; because they are filter feeders, they can accumulate microorganisms that compromise food safety and transmit diseases to consumers. The effectiveness of a depuration system for reducing the microbial load in four species of bivalves marketed in Ecuador Anadara tuberculosa, Anadara similis, Magallana gigas, and Mytella strigata was evaluated by comparing microbial concentrations before and after depuration for periods ranging from 0 to 72 hours. Total and thermotolerant coliforms, Escherichia coli, and mesophilic aerobic bacteria were quantified using standard techniques. Antimicrobial susceptibility and the presence of resistance genes were determined in E. coli isolates. The results showed that total coliforms and mesophilic aerobes fluctuated during treatment. Thermotolerant coliforms tended to decrease. All species showed reductions of nearly 1 logarithmic unit for E. coli, but E. coli exhibited a significant decrease only in relation to treatment duration in M. gigas (adj. p = 0.012). 42.8% of the strains analyzed were resistant to at least one antibiotic, with the highest resistance observed for AMP (23.5%), followed by NOR and AMC (9.5%); furthermore, the presence of the blaTEM, blaSHV, and blaCTX-M genes was detected, indicating the potential for resistance transfer among microorganisms. The depuration system made it possible to meet the microbiological criteria established by the Codex Alimentarius for the four species evaluated, demonstrating its potential as a strategy for improving the microbiological quality and safety of bivalve mollusks intended for human consumption in Ecuador.***

Keywords-- ***Depuration, Bivalve mollusks, microbiological quality, antimicrobial resistance, resistance genes.***

Sistema de Depuración como una alternativa para la reducción de microorganismos en moluscos bivalvos provenientes de zonas de pesca en Ecuador

Marynes Montiel[1]; César González[2]; Luís Valdiviezo[3]; Alba L. Navarrete[4]; Nicole Tiscama-Checa[5]; Jorge Silva-Leon[6]; Felix Morales[7]

[1,2,3,4,5,7] *Facultad de Ciencias de la Vida, Escuela Superior Politécnica del Litoral, ESPOL, Campus Gustavo Galindo, Km. 30.5 Vía Perimetral, Guayaquil, 090902, Ecuador. marymont@espol.edu.ec,* cesagonz@espol.edu.ec*, lrvaldiv@espol.edu.ec, allunava@espol.edu.ec, atiscama@espol.edu.ec,* femorale@espol.edu.ec

[6] Facultad de Ingeniería Mecánica y Ciencias de la Producción, Escuela Superior Politécnica del Litoral, ESPOL, Campus Gustavo Galindo, Km. 30.5 Vía Perimetral, Guayaquil, 090902, Ecuador. *jfsilva@espol.edu.ec*

Resumen- ***Los moluscos bivalvos son un producto de alto valor nutritivo y comercial; por ser filtradores, pueden acumular microorganismos que comprometen la inocuidad y transmitir enfermedades a sus consumidores. Se evaluó la eficacia de un sistema de depuración para la reducción de la carga microbiana en cuatro especies de bivalvos comercializados en Ecuador: Anadara tuberculosa, Anadara similis, Magallana gigas y Mytella strigata, comparando las concentraciones microbianas antes y después de depurados de cero a 72 horas. Se cuantificaron los coliformes totales y termotolerantes, Escherichia coli y bacterias aerobias mesófilas, siguiendo técnicas estándar. Se determinó la susceptibilidad antimicrobiana y la presencia de genes de resistencia en aislados de E. coli. Los resultados mostraron que los coliformes totales y los aerobios mesófilos fluctuaron durante el tratamiento. Los coliformes termotolerantes tendieron a la reducción. Todas las especies alcanzaron reducciones cercanas a 1 unidad logarítmica para E. coli, pero esta solo presentó una disminución significativa con respecto al tiempo de depuración en M. gigas (p.adj = 0.012). El 42.8% de las cepas analizadas presentaron resistencia al menos a un antibiótico, observándose la mayor resistencia a AMP (23.5%), seguido de NOR y AMC (9.5%); además, se determinó presencia de los genes blaTEM, blaSHV y blaCTX-M indicando la posibilidad de transferir la resistencia entre microorganismos. El sistema de depuración permitió cumplir los criterios microbiológicos establecidos por el Codex Alimentarius en las cuatro especies evaluadas, evidenciando su potencial como estrategia para mejorar la calidad microbiológica e inocuidad de los moluscos bivalvos destinados al consumo humano en Ecuador.***

Palabras clave. Depuración, moluscos bivalvos, calidad microbiológica, resistencia a antimicrobianos, genes de resistencia

I. Introducción

Las enfermedades transmitidas por alimentos representan a nivel mundial, uno de los principales problemas de salud, influyendo de manera significativa en las tasas de mortalidad, morbilidad y pérdidas económicas [1]. Entre los alimentos de origen animal, asociados a ambientes acuáticos, los bivalvos representan un grupo de moluscos de interés debido a su importancia comercial y su valor como recurso alimentario para las comunidades costeras [2]. Sin embargo, representan un importante riesgo microbiológico debido a que su consumo se basa frecuentemente en preparaciones crudas o poco cocidas, lo que favorece la contaminación por microorganismos patógenos [3]. Por esta razón, garantizar su seguridad alimentaria constituye uno de los principales retos dentro de los programas de vigilancia y control de la inocuidad alimentaria [3].

El riesgo sanitario de los moluscos bivalvos está asociado a sus características fisiológicas, al ser organismos filtradores se alimentan mediante la circulación de grandes volúmenes de agua, reteniendo partículas orgánicas suspendidas, fitoplancton y microorganismos presentes en los cuerpos de agua [4]. Este mecanismo favorece la acumulación de microorganismos y otros contaminantes en el líquido intervalvar y sus tejidos blandos. Por esta razón, pueden considerarse vectores de transmisión de enfermedades cuando proceden de áreas contaminadas [3].

La contaminación microbiológica de los moluscos bivalvos está estrechamente relacionada con las características del ecosistema donde se desarrollan y las actividades antropogénicas presentes en su entorno, entre ellas las descargas de aguas residuales, la escorrentía agrícola y el crecimiento urbano. Estas fuentes favorecen la incorporación y proliferación de microorganismos indicadores de contaminación fecal al ambiente acuático, siendo *Escherichia coli* uno de los principales indicadores utilizados para evaluar la contaminación fecal en moluscos bivalvos, junto a los coliformes y el recuento de aerobios mesófilos [3].

Así mismo la presencia de organismos resistentes a antimicrobianos en estos ambientes es importante, debido a su papel como reservorio de genes de resistencia. Por ello, la caracterización fenotípica mediante pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, complementada con la detección de genes de resistencia mediante herramientas de biología molecular, permite obtener una evaluación más integral de los microorganismos en los moluscos bivalvos, lo cual puede ser considerado al evaluar la eficacia de los procesos de depuración y de su posible diseminación [5].

El Codex Alimentarius CXS 292-2008 establece recomendaciones para garantizar la inocuidad de estos

productos mediante programas de control sanitario y criterios microbiológicos aplicados por la autoridad competente [6].

Diversos estudios realizados en Ecuador, específicamente en el Estero Salado de Guayaquil y el estuario del río Chone, han evidenciado la presencia de *E. coli* en ejemplares de *Mytella strigata*, *Anadara tuberculosa*, *Anadara similis* y ostras, lo que muestra la influencia de las condiciones sanitarias del ambiente sobre la calidad microbiológica de estos organismos [1]. Estos hallazgos reflejan la necesidad de fortalecer las estrategias de vigilancia microbiológica y los procesos de depuración, con el objetivo de reducir el riesgo sanitario asociado al consumo humano de moluscos bivalvos.

La depuración constituye una de las principales técnicas de control microbiológico post cosechas empleadas en moluscos bivalvos vivos. Este proceso se basa en mantener los organismos en un sistema con condiciones controladas que favorecen su actividad fisiológica de filtración, mientras el agua es continuamente tratada para eliminar los contaminantes presentes, permitiendo así la reducción progresiva de la carga microbiológica acumulada en sus tejidos [7]. Su eficacia depende de diversos factores, como la temperatura, la salinidad, el oxígeno disuelto disponible, el tiempo de depuración y las características fisiológicas de cada especie, por lo cual se hace necesario diseñar sistemas adecuados a las condiciones de cada región. En Ecuador, el Acuerdo Ministerial MPCEIP-SAC-2021-0001-A, establece los lineamientos para la implementación y control de centros de depuración de moluscos bivalvos, evidenciando el interés por incorporar esta estrategia dentro de los programas de inocuidad alimentaria [8].

Un sistema de depuración de circuito cerrado fue diseñado por nuestro equipo de investigación, de acuerdo con los lineamientos de la FAO y la norma ecuatoriana NTE INEN 2729:2013, cuya viabilidad técnica fue evaluada para entornos regionales y nacionales de Ecuador [9] [10]. El presente estudio tiene como objetivo evaluar la eficacia de un sistema de depuración para la reducción de la carga microbiológica en especies de moluscos bivalvos de interés comercial en Ecuador, mediante la comparación de las concentraciones microbianas antes y después del tratamiento.

II. Materiales y Métodos

A. Sistema de depuración

El proceso de depuración se realizó en un sistema cerrado de recirculación continua, diseñado y construido por el equipo de investigación, para moluscos bivalvos adaptado a las condiciones del Ecuador [10]. En general, el sistema está constituido por tanques de polipropileno, con cestas apilables para los moluscos, una bomba de recirculación y un tubo difusor con perforaciones que permiten la dispersión del agua. Para el tratamiento del agua se cuenta con un filtro de sedimento y con luz UV. El sistema está constituido por 3 tanques, lo cual permite las réplicas al momento de la evaluación del proceso.

B. Proceso de depuración y toma de muestras

Cuatro especies diferentes de moluscos bivalvos fueron recolectadas en diversos sitios del Ecuador y evaluadas durante el proceso de depuración: *Anadara tuberculosa* (Puerto El Morro, Guayas), *Anadara similis* (Puerto Jeli, El Oro), *Magallana gigas* (El Palmar, Santa Elena) y *Mytella strigata* (Mercado, Guayas).

Se realizó el proceso de depuración de cada especie colocando 90 individuos, previamente lavados con agua destilada, en cada tanque (A, B y C) distribuidos en 6 bandejas, con 15 individuos en cada una. Los análisis microbiológicos se realizaron a las 0 h, 24 h, 48 h y 72 h.

C. Análisis microbiológico

Preparación del homogeneizado. Para los análisis microbiológicos se seleccionaron al azar 12 individuos de cada tanque, los cuales fueron lavados con agua destilada y se extrajo todo el contenido intervalvar. Se pesaron 25 g del material extraído (tejido y líquido) y se colocaron con 225 ml de caldo lactosado para los coliformes y agua peptonada para los aerobios mesófilos. La homogeneización se realizó durante 2 min en una licuadora a máxima velocidad [11].

Cuantificación de coliformes. Los coliformes totales y termotolerantes fueron cuantificados mediante la técnica del número más probable (NMP). Se inocularon series de 3 tubos de caldo lactosado con 10 mL, 1 mL y 0.1 mL del homogeneizado preparado para las muestras de moluscos o del agua del sistema y se incubaron a 37 °C durante 24–48 h. Los tubos positivos se transfirieron a caldo bilis verde brillante y se incubaron en las mismas condiciones antes descritas, para la cuantificación de los coliformes totales (CT). Para la cuantificación de los coliformes termotolerantes (CTT) los tubos positivos de BVB fueron transferidos a tubos con caldo EC e incubados a 44.5 °C durante 24–48 h. Se realizaron los respectivos cálculos, basados en las tablas de NMP [11].

Cuantificación de *Escherichia coli*. A partir de los tubos positivos de caldo EC se inocularon placas con agar eosina azul de metileno y se incubaron a 37 °C durante 24 h. La presencia de colonias moradas oscuras con brillo verde metálico evidenció la positividad presuntiva para *E. coli*.

Cuantificación de aerobios mesófilos. Los aerobios mesófilos se calcularon mediante la técnica de extendido inoculando alícuotas de 100 µL y 10 µL del homogeneizado o directamente del agua del sistema en placas de agar conteo. Las placas fueron incubadas a 37 °C durante 48 h. A partir de las placas que presentaron de 30 a 300 colonias se determinó las unidades formadoras de colonias (UFC) de acuerdo a los descrito por Robert Blodgett [11]. Los ensayos se realizaron por triplicado para cada una de las especies analizadas.

Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. La determinación de los patrones de susceptibilidad en cepas de *E. coli* aisladas se realizó por la técnica de difusión Kirby-Bauer utilizando un total de 18 antibióticos descritos

para las Enterobacterales [12]. Los cultivos de *E. coli* fueron ajustados a una turbidez equivalente a 0.5 McFarland e inoculados en agar Mueller-Hinton; posteriormente, se colocaron los discos de antibióticos. Las placas se incubaron a 37 °C durante 16–18 h y se midieron los halos de inhibición para compararlos con las tablas publicadas en el CLSI y decidir si la cepa era resistente (R), susceptible (S) o intermedia (I). Se utilizó la cepa *E. coli* 25922 como cepa control. Los antibióticos utilizados fueron los siguientes: cefepima (FEP) (30 µg), cefotaxima (CTX) (30 µg), norfloxacina (NOR) (10 µg), aztreonam (ATM) (30 µg), cefazolina (KZ) (30 µg), ceftazidima (CAZ) (30 µg), cefoxitina (FOX) (30 µg), amikacina (AK) (30 µg), ciprofloxacina (CIP) (5 µg), gentamicina (CN) (10 µg), tobramicina (TOB) (10 µg), amoxicilina/ acido clavulánico (AMC) (30 µg), ampicilina (AMP) (10 µg), ertapenen (ETP) (10 µg), meropenen (MEM) (10 µg), imipenen (IPM) (10 µg), piperacilina/tazobactan (TZP) (110 µg), and ceftriaxona (CRO) (30 µg).

Resistencia genotípica. El ADN genómico de los aislados de *E. coli* fue extraído utilizando el kit E.Z.N.A. Bacterial DNA Kit (Omega Bio-tek, Norcross, GA, EE. UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. La detección de los genes de resistencia *blaTEM, blaSHV* y *CTX_GEN* se realizó mediante PCR de punto final, utilizando primers específicos para cada gen. Cada gen fue amplificado en una reacción independiente. Los productos de amplificación fueron llevados a electroforesis en gel de agarosa para visualizar el segmento de acuerdo con el tamaño en pares de bases (pb).

D. Análisis estadístico

Cada tanque de depuración (A, B y C) fue tratada como una réplica biológica independiente (n = 3). Las mediciones basales (0 h) se obtuvieron a partir de una única muestra compuesta, recolectada previamente a la distribución de los organismos en los tres tanques de depuración, por lo que carecen de réplicas en este punto de tiempo.

Para evaluar si los métodos paramétricos eran apropiados, primero se ajustó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías para cada indicador microbiológico, con especie, tiempo de depuración y su interacción como factores. Los residuales del modelo se evaluaron para normalidad mediante la prueba de Shapiro-Wilk, y para homogeneidad de varianza entre grupos mediante la prueba de Levene.

La selección de la prueba inferencial se determinó de forma independiente para cada indicador, en función del cumplimiento de estos supuestos: en los indicadores donde los residuales no satisficieron el supuesto de normalidad, las diferencias en los conteos log-transformados entre tiempos de depuración se evaluaron mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para cada especie, con comparaciones pareadas post-hoc mediante la prueba de Dunn y ajuste de valores p por el procedimiento de Benjamini-Hochberg (BH); en los indicadores donde se verificaron tanto la normalidad como la homogeneidad de varianza, se aplicó en su lugar un análisis de varianza de una vía para cada especie, con comparaciones post-hoc mediante la prueba de Tukey HSD. En todos los casos, la significancia estadística se estableció en $\alpha = 0.05$.

III. Resultados y Discusión

Se evaluó el desempeño del sistema de depuración en cuatro especies de moluscos bivalvos de importancia comercial en Ecuador mediante el seguimiento de las concentraciones de coliformes totales (CT), coliformes termotolerantes (CTT), *Escherichia coli* (EC) y bacterias aerobias mesófilas (AM) durante un periodo de 72 h.

Las concentraciones iniciales (T=0) de CT, CTT y *E. coli* variaron entre las especies evaluadas. Para los coliformes totales, los valores oscilaron entre 430 NMP 100 g^{-1} en *M. gigas* y valores superiores al límite de detección (>11000 NMP 100 g^{-1}) en *A. similis* y *M. strigata*. Un comportamiento similar se observó para los coliformes termotolerantes, cuyos valores variaron entre 230 y >11000 NMP 100 g^{-1} (Tabla I).

En el caso de *E. coli*, dos de las cuatro especies (*A. similis* y *M. strigata*) presentaron concentraciones iniciales superiores al límite microbiológico de 230 NMP 100 g^{-1} establecido por el Codex Alimentarius para moluscos bivalvos destinados al consumo humano [6], siendo *M. strigata* la que registró la concentración más elevada (2100 NMP 100 g^{-1}), mientras que *M. gigas* permaneció por debajo de este criterio.

TABLA I

MEDIAS GEOMÉTRICAS DE INDICADORES MICROBIOLÓGICOS EN EL TEJIDO DE MOLUSCOS BIVALVOS DURANTE EL PROCESO DE DEPURACIÓN

T (h)	Coliformes (NMP 100 g^{-1})			AM (UFC g^{-1})	T (h)	Coliformes (NMP 100 g^{-1})			AM (UFC g^{-1})
	CT	CTT	EC			CT	CTT	EC	
Anadara tuberculosa					*Anadara similis*				
0	750	230	230	350	0	>11000	11000	290	1300
24	243,26	68,21	20,08	8677	24	>11000	925,79	148,58	8457
48	6151,37	527,01	33,02	6454	48	>11000	678,59	185,60	18748
72	6151,37	390,05	27,46	3575	72	3273,87	184,99	26,88	13755
Magallana gigas					*Mytella strigata*				
0	430	230	92	1300	0	>11000	>11000	2100	66000
24	199,57	32,31	<30	272	24	3273,87	3073,73	517,51	201594
48	619,16	46,31	<30	535	48	>11000	681,70	43,27	227921
72	719,14	26,88	<30	2390	72	776,79	322,30	175,44	48990

Nota: Los valores superiores a >11000 NMP 100 g^{-1} e inferiores a <30 NMP 100 g^{-1} se sustituyeron por 11001 y 15, respectivamente, únicamente para el cálculo de las medias geométricas; sin embargo, en la tabla se presentan utilizando los límites de detección originales.

Estas diferencias en la carga inicial se reflejaron en el comportamiento de los distintos indicadores a lo largo de la depuración. Los coliformes termotolerantes mostraron una tendencia general a la reducción, aunque con fluctuaciones temporales entre especies, mientras que los coliformes totales presentaron una mayor variabilidad, a lo largo del ensayo; la excepción más evidente fue *A. tuberculosa*, en la que las concentraciones de CT y CTT a las 48 y 72 h superaron los valores iniciales. En contraste, *E. coli* mostró el patrón de reducción más consistente entre los tres indicadores, alcanzando las cuatro especies concentraciones dentro del límite microbiológico establecido, aunque con diferencias en el tiempo requerido para alcanzar dicho criterio [6]. Estas diferencias se apreciaron con mayor claridad al analizar la reducción logarítmica de *E. coli* (Fig. 1).

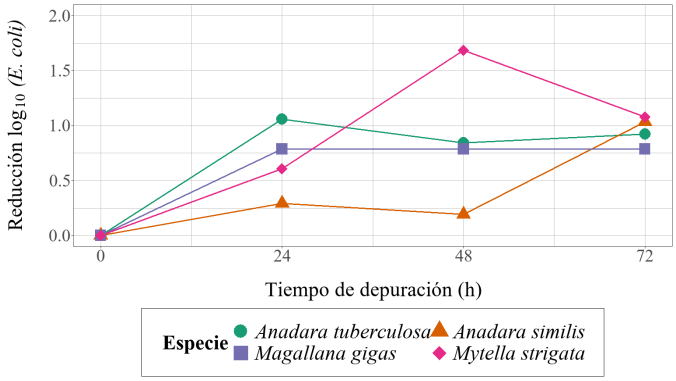


Fig. 1. Reducción logarítmica de *Escherichia coli* durante el proceso de depuración en cuatro especies de moluscos bivalvos**.**

Para determinar si las diferencias observadas entre especies y tiempos eran estadísticamente significativas, se evaluó en primer lugar el cumplimiento de los supuestos de un modelo paramétrico para cada indicador. Los residuales del modelo ANOVA ajustado para *E. coli* no cumplieron el supuesto de normalidad (Shapiro-Wilk, W = 0.920, p = 0.0078), aunque sí se verificó homogeneidad de varianza entre grupos (Levene, F = 0.823, p = 0.646), por lo que las comparaciones se realizaron mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Este análisis reveló un efecto significativo del tiempo de depuración únicamente en *M. gigas* (χ^2 = 9.00, gl = 3, p = 0.029), mientras que no se detectaron diferencias significativas en *A. similis* (p = 0.141), *A. tuberculosa* (p = 0.361) ni *M. strigata* (p = 0.324). El reducido número de réplicas independientes disponibles por tratamiento (n = 3), consecuencia de las limitaciones logísticas de operar múltiples sistemas de depuración UV de forma simultánea, restringe el poder estadístico del análisis para detectar diferencias de menor magnitud, pudiendo contribuir a la falta de significancia en estas tres especies.

Para CTT, en cambio, los residuales del modelo sí cumplieron los supuestos de normalidad (Shapiro-Wilk, W = 0.976, p = 0.532) y homogeneidad de varianza (Levene, F = 0.382, p = 0.971), por lo que se aplicó un análisis de varianza de una vía para cada especie. Si bien el modelo global evidenció diferencias significativas entre especies (F = 7.055, gl = 3, p = 0.0015), el tiempo de depuración no tuvo un efecto significativo dentro de ninguna especie individual (*A. similis*: F = 2.07, p = 0.206; *A. tuberculosa*: F = 0.58, p = 0.648; *M. gigas*: F = 1.56, p = 0.294; *M. strigata*: F = 0.93, p = 0.484), resultado corroborado por las comparaciones post-hoc de Tukey, en las que ninguna diferencia pareada entre tiempos resultó significativa (p.adj > 0.05 en todos los casos). Esto indica que, a diferencia de *E. coli*, la reducción de coliformes termotolerantes no fue estadísticamente consistente en ninguna de las especies evaluadas, en línea con la mayor variabilidad temporal observada de forma descriptiva para este indicador. Dado que *E. coli* fue el único indicador en el que se detectó un efecto significativo del tiempo de depuración en al menos una especie, el análisis inferencial detallado y la discusión que sigue se centran en este indicador.

Centrando la atención en *E. coli*, aun cuando las cuatro especies lograron reducciones cercanas a una unidad logarítmica hacia el final del ensayo, la velocidad de respuesta varió notablemente durante las primeras etapas de la depuración. Las menores reducciones durante las primeras 24 h se registraron en *A. similis* (0,29 ± 0,33 log) y *M. strigata* (0,61 ± 0,58 log), especies que, consistentemente, presentaron también las mayores concentraciones iniciales de *E. coli*. sin embargo, *M. gigas* fue la única especie en la que esta reducción resultó estadísticamente significativa, la prueba post-hoc de Dunn confirmó una disminución significativa de *E. coli* entre el valor basal y las 24, 48 y 72 h (p.adj = 0.012 en los tres casos), sin diferencias adicionales entre estos últimos tres tiempos (p.adj = 1.00), lo que indica que la reducción bacteriana se concentró principalmente en las primeras 24 h de depuración en esta especie.

Esta relación entre la carga inicial y la velocidad de respuesta es consistente con lo reportado en la literatura, en la cual indican que, la velocidad de depuración depende, entre otros factores, de la carga bacteriana inicial presente en los organismos, señalando que moluscos con bajos niveles de contaminación fecal pueden alcanzar concentraciones aceptables tras aproximadamente 12 h de depuración [13]. En el presente estudio, tres de las cuatro especies (*A. tuberculosa, A. similis* y *M. gigas*) alcanzaron concentraciones inferiores a lo establecido en el Codex Alimentarius durante las primeras 24 h de depuración [6].

Las reducciones logarítmicas observadas en este estudio fueron, sin embargo, inferiores a las descritas en investigaciones previas. En sistemas cerrados con recirculación se han reportado reducciones superiores a 2 unidades logarítmicas de *E. coli* tras 24 h de tratamiento [14]. Asimismo, en sistemas estáticos bajo condiciones controladas de salinidad (35 PSU) se han registrado reducciones de hasta 2,92 log y de hasta 2,44 log a temperatura ambiente (30 ± 1 °C) [15].

Las diferencias observadas entre estudios probablemente reflejan las particularidades de cada diseño experimental,

incluyendo el tipo de sistema empleado, las condiciones ambientales, las características biológicas de las especies evaluadas y la carga bacteriana inicial [16].

A pesar de presentar reducciones logarítmicas menores a las reportadas en otros estudios, el sistema permitió el cumplimiento del criterio microbiológico establecido por el Codex Alimentarius en las cuatro especies [6]. *M. strigata*, que presentó la mayor concentración inicial de *E. coli*, requirió un tiempo de depuración de 48 h para cumplir dicho criterio microbiológico, mientras que las demás especies lo alcanzaron en las primeras 24 h, un resultado que respalda nuevamente la influencia de la concentración inicial de contaminación fecal sobre el tiempo requerido para la depuración, y sugiere que organismos con elevados niveles iniciales elevados podrían requerir periodos de tratamiento superiores a 24 h bajo las condiciones experimentales evaluadas.

En este sentido, la elevada concentración inicial de *E. coli* en *M. strigata* representa un escenario microbiológico comparable al de moluscos que requieren depuración previa a su comercialización, como ocurre en las zonas de producción clasificadas como tipo B según el reglamento de la Unión Europea [17]. No obstante, dado que los ejemplares fueron adquiridos en un mercado local, tampoco puede descartarse que factores asociados a la manipulación, el transporte o el almacenamiento previo hayan contribuido a las concentraciones iniciales de *E. coli* observadas.

A diferencia de los indicadores de contaminación fecal discutidos hasta aquí, los recuentos de bacterias aerobias mesófilas no mostraron una disminución uniforme durante la depuración, sino una variabilidad considerable entre los diferentes tiempos analizados (Tabla I), con incrementos transitorios respecto a las concentraciones iniciales en algunas especies, particularmente en *M. strigata*. Estas diferencias probablemente reflejan la distinta naturaleza microbiológica de ambos indicadores, mientras *E. coli* constituye un indicador específico de contaminación fecal, las bacterias aerobias mesófilas comprenden un conjunto heterogéneo de microorganismos, integrado por microorganismos propios del ambiente marino, la microbiota del molusco y aquellos incorporados durante la manipulación. Por ello, los recuentos de aerobios mesófilos no reflejan necesariamente la eficacia del proceso de depuración para eliminar microorganismos de importancia sanitaria [18].

Esta diferencia de comportamiento entre grupos bacterianos se explica, en parte, por su localización y mecanismos de eliminación, las bacterias indicadoras de contaminación fecal se localizan principalmente en el contenido intestinal y en las heces o pseudoheces recubiertas de mucosidad, las cuales son expulsadas durante el proceso de filtración cuando los moluscos se encuentran en agua limpia [19]. En contraste, otros microorganismos pueden permanecer asociados a los tejidos mediante mecanismos de adhesión o verse influenciados por factores fisiológicos e inmunológicos del hospedador, lo que explica las diferencias observadas en la dinámica de eliminación entre los distintos grupos bacterianos.

A pesar de esta variabilidad, las concentraciones de bacterias aerobias mesófilas permanecieron por debajo de 10^5 UFC g^{-1} en tres de las cuatro especies evaluadas durante todo el proceso de depuración; únicamente, en *M. strigata* se registraron recuentos superiores a este valor a las 24 y 48 h, aunque las concentraciones disminuyeron nuevamente por debajo de dicho umbral al finalizar el ensayo. En la mayoría de las muestras, estos resultados corresponden a una calidad microbiológica satisfactoria, mientras que los recuentos observados en *M. strigata* a las 24 y 48 h se ubicarían dentro del rango considerado “borderline” [20].

Más allá de la dinámica observada en el tejido de los moluscos, el desempeño del sistema también se reflejó en la calidad microbiológica del agua de recirculación, la cual se mantuvo estable durante el proceso de depuración. En términos generales, las concentraciones de coliformes totales, coliformes termotolerantes y *E. coli* en el agua permanecieron por debajo del límite de detección (<3 NMP 100 mL^{-1}) durante la mayor parte del ensayo. Las únicas excepciones se registraron en el sistema correspondiente a *A. tuberculosa* al inicio del proceso (0 h) y en *M. strigata* a las 24 h, donde se observaron incrementos puntuales en los indicadores microbiológicos; sin embargo, estas concentraciones disminuyen hasta valores mínimos o no detectables en los muestreos posteriores. Estos resultados indican que el sistema fue capaz de mantener condiciones sanitarias adecuadas en el agua de recirculación, evitando la acumulación sostenida de contaminación fecal durante el proceso, y la posterior disminución de coliformes tras los incrementos puntuales evidencia el adecuado funcionamiento del sistema de tratamiento implementado.

El comportamiento observado coincide con estudios previos que han demostrado una elevada eficacia en la reducción de microorganismos indicadores en sistemas de depuración que incorporan radiación ultravioleta [21]. Aunque los sistemas basados en ozono pueden alcanzar eficiencias superiores, la radiación UV presenta ventajas importantes frente a otros métodos de desinfección. A diferencia de la cloración, evita la formación de subproductos tóxicos, como los trihalometanos, y reduce el riesgo de afectar la tasa de filtración, el sabor o las características organolépticas de los moluscos; asimismo, representa una alternativa más sencilla que la irradiación gamma, la cual requiere un estricto control de la dosis para evitar efectos negativos sobre la supervivencia y la calidad sensorial del producto [22].

No obstante, la eficacia observada frente a los indicadores bacterianos evaluados, el proceso de depuración presenta limitaciones frente a otros contaminantes de importancia sanitaria. Virus entéricos, como norovirus y adenovirus, pueden permanecer retenidos en los tejidos de los moluscos durante periodos prolongados [23]; esta detección no fue incluida en el presente estudio debido a que este fue diseñado con base en las exigencias de la normativa ecuatoriana.

En consecuencia, futuras investigaciones deberían incorporar estos contaminantes para realizar una evaluación

integral del desempeño del sistema. Esta evaluación integral podría complementarse, además, con el estudio del comportamiento del sistema en relación con ciertos parámetros fisicoquímicos, como el oxígeno disuelto y la temperatura, los cuales fueron medidos diariamente a las 8 y 17 horas y promediados (ante la imposibilidad de hacer mediciones continuas), reportando ligeras variaciones (datos no mostrados), así como con estudios de simulación computacional de fluidos para estudiar la distribución del agua y sus características fisicoquímicas, lo cual complementaría la modelación hidráulica del sistema descrito en un estudio previo [10].

Además, más allá del desempeño microbiológico del sistema, su viabilidad práctica depende también de factores operativos y económicos: se adelantan estudios de costos operativos, capacidad de escalamiento y adopción potencial por parte de pescadores artesanales. Los resultados previos señalan una capacidad de escalamiento factible, ajustada a las necesidades de la producción de los pescadores en una zona de Guayas y una sólida viabilidad financiera con alta aceptación del sistema por productores y consumidores del valor agregado y una rápida recuperación del capital.

Se analizaron un total de 21 cepas de *E. coli* identificadas durante el proceso de depuración de las diferentes especies de moluscos bivalvos estudiadas. El número de cepas está limitado al número de cepas de *E. coli* que se logró aislar durante el experimento de depuración. El 42.8% de las cepas analizadas presentaron resistencia al menos a un antibiótico. La mayor resistencia se presentó en AMP (23.5%), seguida de NOR y AMC (9.5%). Se presentó resistencia intermedia a CTX, ATM, CIP, e IMP, en un 4.8% de las cepas estudiadas, contrastando con diferentes porcentajes para AMC (33.3), AMP (19%), AK (14.3%) y TZP (9.5%). No se evidenció resistencia a CEP, KZ, CAZ, FOX, CN, TOB, ETP, MEM, CRO. (Fig. 2).

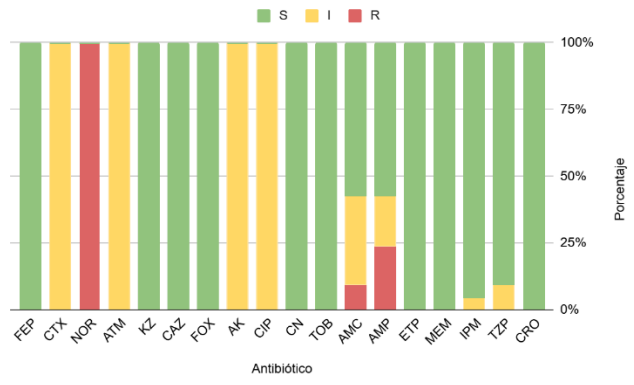


Fig. 2. Porcentajes de susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *E. coli* aisladas de moluscos bivalvos durante el proceso de depuración. S: sensible, I: resistencia intermedia, R: resistente, FEP: cefepima, CTX: cefotaxima, NOR: norfloxacina, ATM: aztreonam, KZ: cefazolina, CAZ: ceftazidima, FOX: cefoxitina, AK: amikacina, CIP: ciprofloxacina, CN: gentamicina, TOB: tobramicina, AMC: amoxicilina/ ácido clavulánico, AMP: ampicilina, ETP: ertapenen, MEM: meropenen, IPM: imipenen, TZP: piperacilina/tazobactan, CRO ceftriaxona.

El gen *blaTEM* predominó en los aislados, con una frecuencia mayor al 75%, seguido de *blaSHV* con un 19%. En contraste, *blaCTX-M* fue detectado únicamente en un 5% (Fig. 3).

Al comparar los patrones de susceptibilidad antimicrobiana con la presencia de estos determinantes genéticos en *E. coli* procedente de *A. similis* y *M. strigata* durante el proceso de depuración, se evidenció una notable variabilidad entre los patrones fenotípicos y genotípicos (Tabla II). En *A. similis*, destacó la persistencia de cepas resistentes a norfloxacina (NOR) hasta las 24 h y con susceptibilidad intermedia a ampicilina (AMP), manteniéndose la detección del gen *blaTEM* desde las 0 h hasta las 48 h, mientras que blaSHV se identificó únicamente a las 24 h.

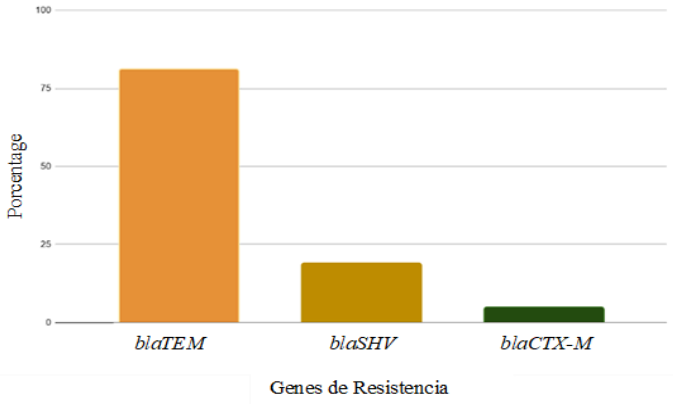


Fig. 3. Porcentajes de genes presentes en moluscos bivalvos durante el proceso de depuración.

Por su parte, en *M. strigata*, la resistencia fenotípica a AMP se presentó a partir de las 24 h y la susceptibilidad intermedia a amoxicilina con ácido clavulánico (AMC) permaneció durante todo el proceso. El gen *blaTEM* se identificó durante todo el proceso de depuración, *blaSHV* se reportó desde las 24 h hasta las 72 h, mientras que *blaCTX-M* solo se detectó en el aislamiento de las 72 h (Tabla II).

TABLA II

DISTRIBUCIÓN DE SUSCEPTIBILIDAD FENOTÍPICA Y GENES DE RESISTENCIA A LOS DIFERENTES TIEMPOS DURANTE EL PROCESO DE DEPURACIÓN.

T (h)	R	I	Genes
Anadara similis			
0	NOR, AMC,	AMP, IMP, TZP	*blaTEM*
24	NOR	AMP, AK	*blaTEM, blaSHV*
48		AMP, CTX, AMC	*blaTEM*

Mytella strigata			
0		CIP, AMC	*blaTEM*
24	AMC, AMP	AMC, ATM	*blaTEM*, *blaSHV*
48	AMP	AMC	*blaTEM*, *blaSHV*
72	AMP	AMC	*CTX*gen, *blaTEM*, *blaSHV*

T: tiempo, R: resistente, I: resistencia intermedia, NOR: norfloxacina, AMC: amoxicilina/ácido clavulánico, AMP: ampicilina, IPM: imipenen, TZP: piperacilina/tazobactan, AK: amikacina, CTX: cefotaxima, CIP: ciprofloxacina, ATM: aztreonam.

El predominio de *blaTEM* observado en los aislamientos de *E. coli* coincide con lo reportado en la literatura, donde este gen es descrito como uno de los principales determinantes asociados a las β-lactamasas de espectro extendido (BLEE), destacando la importancia de la detección de los genes *blaTEM*, *blaSHV* y *blaCTX-M* debido a su participación en la resistencia a β-lactámicos y su circulación en diferentes reservorios ambientales [24].

La presencia de estos determinantes genéticos a lo largo del proceso de depuración puede estar relacionada con su capacidad de mantenerse y diseminarse entre poblaciones bacterianas. Estos genes pueden dispersarse mediante transferencia horizontal, incluyendo mecanismos como la conjugación y transformación, mientras que elementos genéticos móviles, como plásmidos, transposones, secuencias de inserción e integrones, pueden contribuir a su propagación [25]. Esto indica que la reducción de la carga bacteriana durante la depuración no necesariamente implica la eliminación de los determinantes genéticos de resistencia detectados en los aislamientos recuperados.

Desde una perspectiva ambiental y de salud pública, la presencia de bacterias portadoras de genes de resistencia en moluscos destinados al consumo representa un aspecto importante para la inocuidad alimentaria, por ello, la evaluación de la eficacia de los procesos de depuración debe integrar la caracterización fenotípica y genotípica de las bacterias recuperadas durante el proceso, permitiendo una evaluación más completa de la reducción de la contaminación microbiológica y de la presencia de determinantes de resistencia que podrían representar un riesgo para la salud humana.

IV. Conclusiones

El sistema de depuración de circuito cerrado desarrollado para esta investigación demostró ser eficaz para reducir los indicadores de contaminación fecal de mayor importancia sanitaria. Las cuatro especies de moluscos evaluadas alcanzaron concentraciones de *E. coli* por debajo del límite microbiológico permisible de 230 NMP 100 g^{-1} establecido por el Codex Alimentarius para el consumo humano. Se evidenció que la velocidad de depuración depende de la carga bacteriana inicial de cada especie: mientras que *A. tuberculosa, A. similis y M. gigas* cumplieron la normativa a las 24 h de tratamiento, *M. strigata* la cual inició con la mayor concentración de *E. coli,* requirió un periodo de 48 h. Por otro lado, la variabilidad observada en el recuento de aerobios mesófilos confirmó que estos microorganismos, originarios del ambiente estuarino, no constituyen un indicador directo de la tasa de eliminación fecal.

El sistema diseñado, compuesto por filtración de sedimentos y desinfección mediante luz ultravioleta, garantiza un entorno sanitario estable durante los procesos de depuración. Los niveles de CT, CTT y *E. coli* en el agua se mantuvieron por debajo del límite de detección durante la mayor parte del ensayo, mientras que los incrementos detectados al inicio del proceso en ciertas especies fueron contrarrestados en los muestreos posteriores. Estos hallazgos validan el diseño del circuito cerrado de recirculación continua, demostrando que la filtración y desinfección UV previenen la acumulación de contaminantes microbiológicos expulsados por los organismos sin la necesidad de recurrir a insumos químicos que alteren su fisiología de filtración o generen subproductos tóxicos.

Se identificó la presencia de resistencia a antibióticos de uso clínico y de genes de resistencia en las cepas evaluadas, presentando el mayor porcentaje la resistencia a ampicilina. Se evidenció la prevalencia del gen *blaTEM* (>75%), seguido de *blaSHV* (19%) y *blaCTX-M* (5%), detectados a lo largo del proceso en *A. similis y M. strigata.* Aunque la depuración redujo la carga bacteriana total, la persistencia de estos genotipos resalta la función de los bivalvos como bioindicadores y reservorios de resistencia antimicrobiana en los ecosistemas acuáticos locales.

Aunque el alcance geográfico del estudio se concentró en tres provincias del sur de Ecuador, la consolidación de este diseño de depuración representa una solución aplicable y transferible a todos los sectores de pesca artesanal y recolección local en el Ecuador. Al garantizar la inocuidad alimentaria postcosecha se disminuye la incidencia de enfermedades relacionadas al consumo de alimentos, se mejora la competitividad del sector pesquero artesanal y se fortalece el desarrollo de las comunidades que se benefician ofertando un producto con valor agregado que en un futuro puede competir con los estándares de comercialización internacional de moluscos bivalvos.

Reconocimiento

Estudio financiado a través del Proyecto DepuPlant "Depuración de moluscos bivalvos como un aporte a la producción responsable y sostenible de la vida marina" registrado bajo el No. FCV-16-2021 con financiamiento de la ESPOL y GIZ en el marco del programa COCIBIO.

Referencias

[1] A. E. Bermúdez-Medranda, R. P. Panta-Vélez, L. Cáceres-Farías, and C. Lodeiros, "Bacterial contamination indices in the oyster *Crassostrea* cf. corteziensis from Portovelo, Río Chone estuary, Manabí, Ecuador," *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, vol. 38, pp. 483–491, Oct. 2022, doi: 10.20937/RICA.54239.

[2] E. Prado-Carpio, M. de L. Olivo-Garrido, M. Quiñonez-Cabeza, C. M. Beitl, M. Martínez-Soto, and C. Rodríguez-Monroy, "Performance and challenges in the value chain of the *Anadara tuberculosa* bivalve mollusk in Ecuador," *Sustainability (Switzerland)*, vol. 13, no. 19, Oct. 2021, doi: 10.3390/su131910863.

[3] M. A. Orden-Mejía, D. C. Zambrano-Conforme, F. G. Zamora-Flores, and D. Quezada-Tobar, "Ethnic food: A microbiological evaluation of black shellfish ceviche that is sold in typical restaurants," *Int. J. Gastron. Food Sci.*, vol. 25, Oct. 2021, doi: 10.1016/j.ijgfs.2021.100395.

[4] A. Yee-Duarte, "¿Qué nos dicen los moluscos bivalvos sobre la contaminación marina?," *Ciencia y Mar*, vol. 87, pp. 65–70, 2025, doi: 10.59673/cym.v29i87.70.

[5] R. R. Dewi *et al.*, "Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Vibrio* Derived from Farm-Raised Red Hybrid Tilapia (*Oreochromis* spp.) and Asian Sea Bass (Lates calcarifer, Bloch 1970) on the West Coast of Peninsular Malaysia," *Antibiotics*, vol. 11, no. 2, p. 136, Jan. 2022, doi: 10.3390/antibiotics11020136.

[6] Codex Alimentarius Commission, "Standard for Live and Raw Bivalve Molluscs," 2024. Accessed: Mar. 27, 2026. [Online]. Available: https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/ru/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXS%2B292-2008%252FCXS_292e.pdf.

[7] M. Asaduzzaman et al., "Depuration efficiency of raft-cultivated Perna viridis: Interactive effects of salinity, exposure time, and body size on the removal of microbial pathogens and trace/toxic elements for seafood safety," Aquaculture, vol. 622, Jul. 2026, doi: 10.1016/j.aquaculture.2026.744083.

[8] MPCEIP, *Plan regulatorio MPCEIP-SAC2021-0001-A*. 2021. Accessed: Jul. 31, 2026. [Online]. Available: https://www.produccion.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2021/10/Plan-Regulatorio-Institucional-MPCEIP-2021.pdf.

[9] R., Lee, A., Lovatelli, and L. Ababouch, *Depuración de bivalvos: aspectos fundamentales y prácticos*, vol. No. 511. Roma: FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura), 2010

[10] J. Silva-Leon, M. I. Moreno Fajardo, D. A. Noblecilla Bustamante, F. E. Morales, M. Montiel, and J. Nieto, "Design Process and Implementation of a Closed-Circuit System for Bivalve Molluscs Depuration," *OCEANS 2023 - Limerick, OCEANS Limerick 2023*, 2023, doi: 10.1109/OCEANSLIMERICK52467.2023.10244277.

[11] Robert Blodgett, "BAM Appendix 2: Most Probable Number from Serial Dilutions | FDA." Accessed: Mar. 15, 2026. [Online]. Available:

[12] CLSI, "Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 34th ed. CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute."

[13] N. B. Barile *et al.*, "Study of the efficacy of a closed cycle depuration system on bivalve molluscs," *Vet. Ital.*, vol. 45, no. 4, pp. 555–566, Accessed: Jul. 27, 2026. [Online]. Available: www.izs.it/vet_italiana.

[14] N. D., Andritsos, G., Moschonas, and D. Roukas, "ELIMINATION OF *Escherichia coli* FROM MUSSELS DURING TREATMENT IN A SHELLFISH DEPURATION SYSTEM," 2016.

[15] S. Chinnadurai, K. Elavarasan, V. Geethalakshmi, V. Kripa, and K. S. Mohamed, "Development of a depuration protocol for commercially important edible bivalve molluscs of India: Ensuring microbiological safety," *Food Microbiol.*, vol. 110, p. 104172, Apr. 2023, doi: 10.1016/J.FM.2022.104172.

[16] S. Chinnadurai, K. S. Mohamed, J. Sharma, V. Venkatesan, and V. Kripa, "Assessment of bio-accumulation of bacteria in oysters from shellfish growing waters in Ashtamudi Lake (Kerala, India): A RAMSAR wetland," *Reg. Stud. Mar. Sci.*, vol. 7, pp. 118–122, 2016, Accessed: July. 27, 2026. [Online]. Available: http://dx.doi.org/10.1016/j.rsma.2016.05.016 .

[17] Comisión Europea, "REGLAMENTO DE EJECUCIÓN (UE) 2019/627," 2019.

[18] G. P. Richards, "Microbial Purification of Shellfish: A Review of Depuration and Relaying," *J. Food Prot.*, vol. 51, no. 3, pp. 218–251, Mar. 1988, doi: 10.4315/0362-028x-51.3.218.

[19] J. Oliveira, A. Cunha, F. Castilho, J. L. Romalde, and M. J. Pereira, "Microbial contamination and purification of bivalve shellfish: Crucial aspects in monitoring and future perspectives - A mini-review," 2011, doi: 10.1016/j.foodcont.2010.11.032

[20] Food Safety Authority of Ireland, Guidelines for the interpretation of results of microbiological testing of ready-to-eat foods placed on the market. Food Safety Authority of Ireland, 2014.

[21] C. E. de F. Guimarães Filho, L. R. C. de Oliveira, G. L. de P. A. Ramos, F. A. A. Calixto, M. C. Kasnowski, and E. de F. M. de Mesquita, "Study of the efficacy of three depuration methods as a prerequisite for the hygiene-sanitary program in bivalve molluscs, from mariculture in Jurujuba, Niterói, Brazil," *Food Control*, vol. 168, p. 110900, Feb. 2025, doi: 10.1016/J.FOODCONT.2024.110900.

[22] A. Martinez-Albores *et al.*, "Complementary Methods to Improve the Depuration of Bivalves: A Review," *Foods*, vol. 9, no. 2, p. 129, 2020, doi: 10.3390/FOODS9020129.

[23] C. E. de F. Guimarães Filho, F. A. A. Calixto, M. C. Kasnowski, and E. de F. M. de MESQUITA, "Depuration of bivalve molluscs: a literature review," *Food Science and Technology*, vol. 42, p. e06622, 2022, doi: 10.1590/FST.06622.

[24] A. H. Pishtiwan and K. M. Khadija, "Prevalence of blaTEM, blaSHV, and blaCTX-M genes among ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolated from thalassemia patients in Erbil, Iraq," *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.*, vol. 11, no. 1, 2019, doi: 10.4084/MJHID.2019.041.

[25] M. H. Effendi, E. B. Hartadi, A. M. Witaningrum, D. A. Permatasari, and E. N. Ugbo, "Molecular identification of blaTEM gene of extended-spectrum beta-lactamaseproducing *Escherichia coli* from healthy pigs in Malang district, East Java, Indonesia," *J. Adv. Vet. Anim. Res.*, vol. 9, no. 3, pp. 447–452, Sep. 2022, doi: 10.5455/javar.2022.i613.