

Evaluación de tres técnicas microbiológicas utilizadas para detectar coliformes totales y fecales en muestras de agua

Alexis De La Cruz L.¹

¹ M.Sc. Profesor, Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Naturales Exactas y Tecnología, Centro Regional Universitario de Azuero, Universidad de Panamá; alexish2o2@hotmail.com

Resumen: En el presente estudio se hace una evaluación entre la técnica tradicional por membrana filtrante, con dos nuevas técnicas de análisis microbiológico: la técnica de Petrifilm y de sustrato definido o prueba de Colilert, para la detección del grupo de coliformes totales y coliformes fecales en muestras de agua. Las muestras, sometidas a las tres diferentes evaluaciones microbiológicas de agua, fueron obtenidas de cinco acueductos rurales en la provincia de Los Santos, durante el mes de octubre. Los resultados obtenidos para cada una de las técnicas de análisis, arrojaron recuentos mayores del número de coliformes totales en la técnica de Petrifilm; no obstante, en la técnica del sustrato definido (Colilert) se detectó mayor número de coliformes fecales; esto se sustentó en la evaluación estadística, donde demostró que solamente se encontraron diferencias significativas entre la técnica de Petrifilm y la membrana por filtración, respecto a la detección de coliformes totales. El análisis de varianza y la correlación determinaron que la técnica de sustrato definido, en donde se evalúa de manera simultánea coliformes totales y *E. coli*, detectó más unidades de colonias de *E. coli*. En este estudio, se concluye que las técnicas de Petrifilm y de sustrato definido (Colilert) cuantificaron mayor número de coliformes.

Palabras claves: Coliformes totales, coliformes fecales, bacterias coliformes, membrana filtrante, Petrifilm, sustrato definido.

Abstract: In the present study, an evaluation has been made comparing the traditional techniques of membrane filtration with the new microbiological analytical procedures of water using the Petrifilm technique, the defined substrate procedure for the fecal and total coliform, and the Colilert test for determining the group of coliforms and fecal coliforms. The samples tested with the three different microbiological evaluations of water, were obtained from five rural aqueducts located in the province of Los Santos in October. This research is not experimental and the results obtained from each of the techniques of analyzing water through the Petrifilm technique resulted in a greater number of total coliforms. On the other hand, the defined substrate procedure (Colilert) showed a greater number of fecal coliforms. This was tested through the statistic evaluation, which indicates that there are only significant differences between the Petrifilm technique and the membrane filtration procedure regarding the finding of total coliforms. Nevertheless, the defined substrate procedure is based on the principle of using the defined substrate through which total coliforms and *E. coli* are simultaneously detected and the variance analyses and correlation as well determine that the former showed more units of colonies of *E. coli*.

Key words: Total coliforms, fecal coliforms, coliform bacteria, membrane filter, Petrifilm, defined substrate.

1. Introducción

Tradicionalmente y por mucho tiempo, se han empleado los métodos de membrana filtrante para el análisis y evaluación de la calidad bacteriológica del agua potable, en la que normalmente se concentran 100 mililitros de agua, y se cultivan en un medio diferencial como el lauril sulfato o Endo Les agar, que se basan en el principio de la fermentación de la lactosa (APHA, 1995).

Lo anterior es confirmado por Reynolds (2001), quien señala que en países como Estados Unidos, en donde utilizan esta técnica para la recuperación del grupo de los coliformes, han planteado serios cuestionamientos para predecir el aseguramiento del abastecimiento de agua, toda vez que resultan en falsos positivos.

De esta forma, a fines de los ochenta se desarrolló una nueva tecnología denominada sustrato definido (Colilert), basada en el principio de un sustrato específico que solamente puede ser degradado enzimáticamente por el grupo de las bacterias coliformes, ya que estas poseen la enzima β -galactosidasa y de manera simultánea determina, al mismo tiempo, la presencia de *E. coli*, ya que posee la enzima β -galactopiranosido que puede degradar el sustrato galactoparatosido (Alarcón, 1996). El método del sustrato definido (Colilert) es un producto de amplio uso en Inglaterra y en otros países como Costa Rica, en los que muestras de aguas analizadas por esta última, han arrojado diferencias significativas al compararla con la técnica de membrana filtrante (Cowburn *et al.*, 1994).

Lo planteado anteriormente, deriva de la problemática de que mucho de los microorganismos coliformes son enmascara-

dos por la competencia heterotrófica o flora de acompañamiento, resultando en la búsqueda de metodologías alternativas que supriman estas interferencias (Brenner *et al.*, 1993). Es aquí, que el método de sustrato definido se basa exclusivamente en el principio de la actividad enzimática, donde los microorganismos son seleccionados por el uso de sustratos específicos cromogénicos como fluorogénicos (Fricke *et al.*, 1994).

La técnica del sustrato definido se puede interpretar, por la presencia o ausencia del grupo coliformes y *E. coli*, como cuantificable, basado en el uso de dispositivos de Quanty-Tray, utilizando el criterio del número más probable (Cowburn *et al.*, 1994). Al igual que otras técnicas específicas, se ha venido desarrollando la de Petrifilm, que es ampliamente reconocida por la Asociación de Estándares Canadiense (AOAC, por sus siglas en inglés), en los análisis bacteriológicos de alimentos; sin embargo, se han desarrollado intentos por aplicarlo en análisis de aguas (Rodríguez, 1995).

Por otro lado, la técnica de Petrifilm puede ser utilizada para el recuento específico de coliformes y *E. coli*; en la que se siembra la muestra en un agente gelificante que contiene nutrientes como la bilis verde brillante y un indicador de la actividad de laglucoronidasa, que facilita la enumeración de las colonias, donde *E. Coli* se visualiza como colonias de color azul, asociada con gas o burbuja; en tanto que los coliformes, como colonias rojas, también asociadas con burbuja (Rodríguez, 1995).

Esta técnica se estandarizó, principalmente, para ser utilizada en el análisis de parámetros microbiológicos como colifor-

mes, enterobacterias, hongos y levaduras, en muestras de alimentos; sin embargo, para el análisis de muestras de agua, aún no está normado (Broce, 2005). Por otro lado, en diversos estudios realizados en la Universidad de Panamá por la Escuela de Biología, han concluido que la técnica de Colilert tiene una alta sensibilidad en la detección de coliformes totales y *E. coli*, en muestras que aparentemente resultaron ser falsos positivos (Quintero, 2010).

Es por ello que cada programa e institución dedicada a la vigilancia rutinaria del agua, debe someter estas técnicas a procesos de validación, para determinar la precisión y confiabilidad de las mismas. Como aporte a estos procesos se realizó una investigación que evaluó tres técnicas de análisis microbiológicos en aguas, utilizadas para detectar coliformes totales y coliformes fecales (*E. coli*) en muestras de aguas, colectadas a nivel de acueductos rurales en la provincia de Los Santos.

2. Materiales y métodos

2.1. Ámbito de estudio

La investigación consistió en tomar muestras de agua al azar, a nivel de cinco acueductos rurales en el distrito de Tonosí; en cada acueducto, se tomaron tres muestras y sus réplicas. Los acueductos que se tomaron para este estudio pertenecen a las cinco comunidades siguientes: Tonosí Cabecera, Bijagual, Buenos Aires, La Bonita y El Bebedero. Los acueductos fueron monitoreados durante el mes de octubre, en donde se les aplicó tres técnicas de análisis microbiológico: membrana filtrante, Petrifilm y sustrato definido (Colilert).

2.2. Planteamiento de la hipótesis de investigación

La hipótesis es: existen diferencias en la determinación de coliformes totales y fecales para cada una de las tres técnicas: membrana filtrante, Petrifilm y sustrato definido (Colilert).

2.3. Tipo de investigación y variables de estudio

Basado en una investigación cuantitativa, de tipo descriptiva; nuestras variables fueron las técnicas de análisis microbiológico de aguas (membrana filtrante, Petrifilm, y sustrato definido (Colilert), que representan la variable independiente, mientras que nuestra variable dependiente son las colonias de coliformes totales y colonias de coliformes fecales obtenidas mediante estas tres técnicas.

2.4. Procesamiento de las muestras mediante las técnicas microbiológicas

Las muestras de aguas fueron colectadas a nivel de cinco acueductos, por triplicado; se conservaron bajo refrigeración a 4 °C, durante un período de seis horas; después de tomadas las muestras en campo, estas fueron enviadas al Laboratorio de Calidad de Agua del Ministerio de Salud, en la provincia de Los Santos, para su posterior análisis microbiológico.

Las muestras fueron evaluadas a través de tres técnicas, como sigue:

2.4.1. Técnica de membrana filtrante (MF)

Las muestras tomadas a los cinco acueductos fueron filtradas, usando un volumen de agua de 100 ml, a través de una membrana filtrante de 0.45 µm de tamaño

de porosidad, utilizada para atrapar bacterias, y colocada en sendos platos petris con medios nutricionales, como agar m- Endo Les para coliformes totales, y agar MFC con ácido rosólico al 1% para coliformes fecales. Las temperaturas de incubación, para la detección de ambos parámetros, fueron de 37 y 44 °C, respectivamente, durante un período de 24 a 48 horas. Los resultados positivos para el caso de coliformes totales, fueron cuantificados como aquellas bacterias que presentaron un color verde brillante metálico, y para coliformes fecales como colonias con color azul. Para reportar los resultados, se utilizó la fórmula:

UFC (unidad formadora de colonias de coliformes)/100 ml: Número de colonias bacterias x 100/volumen de muestra de agua filtrada

2.4.2. Técnica de Petrifilm (PF)

Las muestras de agua, de manera simultánea, fueron analizadas por esta técnica, que consistió en utilizar placas de Petrifilm específicas para coliformes y *E. coli* (CC-EC), las cuales fueron hidratadas previamente con un mililitro de agua destilada, y el procedimiento aplicado fue el mismo que para la técnica de membrana filtrante, filtrándose un volumen de 100 ml de la muestra de agua, para luego ser cultivada en estas placas, e incubadas a una temperatura de 37 °C por 24 a 48 horas. Los resultados obtenidos fueron tipificados como coliformes totales, a aquellas colonias bacterianas de color rojo asociadas a burbujas; en tanto que para *E. coli*, como aquellas colonias bacterianas de color azul asociadas igual-

mente a burbujas. Los cálculos de las unidades formadoras de colonias (UFC/100 ml), se realizaron con la fórmula planteada para la técnica de membrana filtrante.

2.4.3. Técnica de sustrato definido (Colilert) (SD)

A través de esta técnica, las mismas muestras sometidas a las dos técnicas anteriores, fueron colocadas en un volumen de 100 ml, en envases estériles con tiosulfato de sodio, a los cuales se les agregó un reactivo de basado en la detección de la enzima B galactosidasa, específico para detectar coliformes y *E. coli*. Estas se homogenizaron durante un minuto y luego fueron agregadas en sendas charolas con 51 pocillos, y pasadas a través de un sellador de marca IDEXX, para repartirlas de manera uniforme en cada uno de los 51 pocillos de la charola de la muestra de agua. Estas charolas con las muestras fueron incubadas a 37 °C durante un período de 24 horas. Los resultados positivos de las muestras de agua, para coliformes totales, fueron aquellas que exhibieron un color amarillo, mientras que para el caso de *E. coli*, las muestras positivas, fluorescieron bajo la acción de una lámpara de luz ultravioleta de 400 nm. La interpretación cuantitativa se hizo con la tabla del número más probable (NMP) de bacterias a un 95% de confianza.

Los resultados fueron tabulados y la evaluación estadística se basó en el tipo de diseño experimental escogido, y analizado mediante una varianza simple y correlación de Pearson.

3. Resultados

Los resultados se registraron y se tabularon en el cuadro 1.

Cuadro 1: Recuento de colonias de coliformes, a través de tres técnicas de análisis microbiológicos, en muestras de aguas tomadas de cinco acueductos rurales en la provincia de Los Santos.

Acueducto	Replicas (No. de muestra)	TÉCNICA DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO					
		Membrana filtrante		Petrifilm		Sustrato definido (Colilert)	
		UFC/100 ml coliformes totales	UFC/100 ml coliformes fecales	UFC/100 ml coliformes totales	UFC/100 ml E. coli	NMP/100 ml coliformes totales	NMP/100 ml E. coli
Tonosí	1	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	400	0	0	0
	Media geométrica	0	0	133.3	0	0	0
Bijagual	1	300	0	100	0	420	100
	2	500	0	400	0	200	0
	3	2,100	0	900	0	310	200
	Media geométrica	966.7	0	466.7	0	310.0	100
Buenos Aires	1	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	200	0	0	0
	3	0	0	300	0	0	500
	Media geométrica	0	0	166.7	0	0	166.7
La Bonita	1	200	0	200	0	0	500
	2	100	0	600	0	0	1,200
	3	100	0	400	0	0	800
	Media geométrica	133.3	0	400	0	0	833.3
El Bebedero	1	0	0	0	0	0	100
	2	0	0	0	0	0	100
	3	0	0	0	0	0	0
	Media geométrica	0	0	0	0	0	66.7

Nota: UFC = unidades tomadoras de colonias de coliformes, NMP = número más probable.

Fuente: De la Cruz, A., 2011.

En el cuadro 1, se observa el recuento de colonias de coliformes, tanto totales como coliformes fecales, mediante las técnicas de membrana filtrante, Petrifilm, y sustrato definido (Colilert). Los mismos se transformaron a unidades formadoras de colonias de coliformes para cada una de las tres técnicas; e igualmente, para la homogenización de los resultados, se transformaron a logaritmos, para su posterior análisis estadístico. En este cuadro, se presenta la media geométrica obtenida en

cada acueducto, puesto que se tomaron tres réplicas de cada sistema de abastecimiento de agua.

Igualmente, se presenta los resultados de correlación (cuadro 2) entre cada una de las técnicas, así como la evaluación de la varianza a nivel de cada acueducto.

Adicionalmente, se presentan unas gráficas que permiten observar la diferencia entre cada una de las tres técnicas, en la obtención de los coliformes (figuras 1, 2, y 3).

Cuadro 2. Correlación entre las diferentes técnicas para la evaluación de bacterias coliformes.

	MFCT	MFCF	PFCT	PFCF	SDCT	SDCF
MFCT	1	A	.650*	A	.453	.419
Correlación Pearsona dos colas	-	-	.009	-	.090	.120
N	15	14	15	15	15	15
MFCT	A	A	A	A	A	A
Correlación Pearson a dos colas	-	-	-	-	-	-
N	14	14	14	14	14	14
MFCT	.650*	A	1	A	.152	.485
Correlación Pearson a dos colas	.009	-	-	-	-	.067
N	15	15	15	15	15	15
MFCT	A	A	A	A	A	A
Correlación Pearson a dos colas	-	-	-	-	-	-
N	15	14	15	15	15	15
MFCT	.433	A	.152	A	1	.239
Correlación Pearson a dos colas	.090	-	.588	-	-	.391
N	15	14	15	15	15	15
MFCT	.419	A	.485	A	.239	1
Correlación Pearson a dos colas	.120	-	.067	-	.392	-
N	15	14	15	15	15	15

Nota: MFCT = membrana filtrante para coliformes totales, MFCF = membrana filtrante para coliformes fecales, PFCT = placa de petrifilm para coliformes totales, PFCF = placas de petrifilm para coliformes fecales, SDCT = sustrato definido para coliformes totales, SDCF= sustrato definido para coliformes fecales; A = valor transformado, N = repeticiones.

(*) = altamente significativo.

Fuente: De La Cruz, A., 2011.

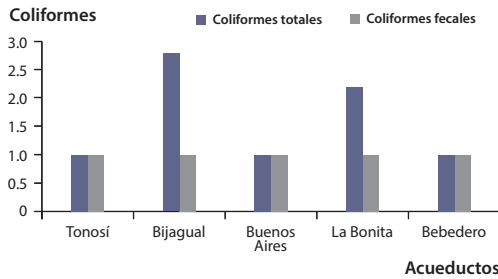


Figura 1. Evaluación de coliformes a muestras de agua de cinco acueductos rurales, mediante la técnica de membrana filtrante UFC (unidad formadora de colonia)

Fuente: De La Cruz, A., 2011.

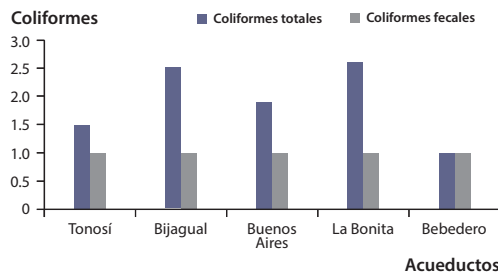


Figura 2. Evaluación de coliformes a muestras de cinco acueductos mediante la técnica de Petrifilm (unidad formadora de colonia)

Fuente: De La Cruz, A., 2011.

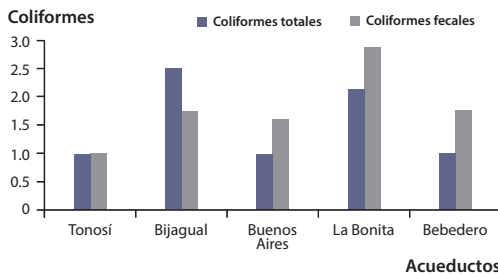


Figura 3. Evaluación de coliformes a muestras de cinco acueductos mediante la técnica de sustrato definido (Colilert) UFC (unidad formadora de colonia)

Fuente: De La Cruz, A., 2011.

4. Discusión

De acuerdo a los resultados obtenidos de los niveles de coliformes totales, a través de las tres técnicas de análisis microbiológicos aplicadas a cada una de las muestras de los acueductos evaluados, se observó que las técnicas de membrana filtrante y Petrifilm, detectaron mayor número de estos microorganismos; sin embargo, de las tres técnicas para esta investigación, la de Petrifilm resultó la técnica donde más se detectó unidades formadoras de colonias de coliformes totales (cuadro 1).

La correlación entre las técnicas de análisis demostró que la técnica de Petrifilm arrojó una correlación fuertemente positiva ($r: .0650, p=.009$), en relación con la técnica de membrana filtrante, lo que significa que ambas técnicas resultaron ser las mejores en la detección de coliformes totales.

Estos mismos hallazgos fueron encontrados en un estudio realizado por la empresa 3M, donde describieron, que la técnica de Petrifilm basada en la actividad de la fermentación de la β -glucoronidasa, al igual que la técnica de la membrana filtrante, permiten recuperar colonias de coliformes totales que se visualizan como colonias de color rojo (Broce, 1995).

El análisis de varianza en los resultados de coliformes totales, a través de las técnicas de membrana filtrante y Petrifilm, determinó una diferencia significativa de $F=3,867, p=.041$ y $F=8.18, p=.004$, con relación a los análisis de varianza de la técnica de sustrato definido, en donde resultó un valor con una $F=4.865, p=.022$. Esto nos indica nuevamente que las técnicas de membrana filtrante y Petrifilm resultaron

ser mejores en la evaluación de coliformes totales, con respecto a sustrato definido. Esto se observa en las figuras 1, 2 y 3, que señalan claramente que la técnica de Petrifilm y membrana filtrante resultaron las mejores en la determinación de coliformes totales, no así sustrato definido.

Con relación a las unidades de coliformes fecales, se observa que la técnica de sustrato definido resultó ser la mejor con respecto a membrana filtrante y Petrifilm (cuadro I, figura 3). La correlación es fuertemente positiva ($t=1$), lo que determina que se detectó más coliformes fecales (*E. coli*) mediante esta técnica, que con las otras dos.

Lo indicado en el párrafo anterior, señala que la técnica de sustrato definido se basa en el principio del uso de un sustrato llamado fluorocult, que aplica para la selección específica de *E. coli*.

Al revisar la correlación de manera general para las tres técnicas, los resultados en esta investigación se mantienen de manera constante, lo que expresa que no existen diferencias mayores entre estas tres técnicas.

5. Conclusiones

Podemos concluir, de acuerdo a esta investigación, que no existen mayores diferencias en la evaluación de coliformes para las tres técnicas; sin embargo, resulta que para la determinación de coliformes totales, la técnica de Petrifilm y membrana filtrante resultaron ser las mejores; en la técnica de sustrato definido, la evaluación fue casi nula; en tanto que, para el parámetro de coliformes fecales (*E. coli*), la técnica

de sustrato definido resultó ser la que más detectó este grupo de microorganismos.

Referencias bibliográficas

- Alarcón, E. (1996). *Tecnología del sustrato definido. Estudio de validación de nueva técnica para el análisis bacteriológico del agua potable*. México: Empresa de Servicios Sanitarios del Libertador, Expert Lab., Inc.
- American Public Health Association (APHA). (1995). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. (19ª ed.). Washington, D.C.: American Public Health Association.
- Brenner, K.P., C. Rankin, Y.R. Roybal, G. Stelma, P. Scarpino y A.P. Dufour. (1993). New medium for the simultaneous detection of total coliforms and *Escherichia coli* in water. *Applied and Environmental Microbiology*, 27 (3): 3534-3544.
- Broce, D. (1995). Evaluación de placas de Petrifilm (3M) para el recuento bacteriano en muestra de alimentos. Entrenamiento al personal de salud. Folleto.
- Cowbum, J.K., T. Goodall, E.J. Fricker, K.S. Walter y C.R. Fricker. (1994). A preliminary study of the use of Colilert for water quality monitoring. *Letters in Applied Microbiology*, 19 (2): 50-52.
- Francy, D.S., D.R. Helsel y R.A. Nally. (2000). Occurrence and distribution of microbiological indicator in ground water and stream water. *Wat. Environ. Res.*, 72 (6), 152-161.
- Fricker, C.R., J. Cowbum, T. Goodall, K.S. Walter y E.J. Fricker. (1994). Use of the colilert system in a large UK water uti-

- lity. En: *Proceedings of the Water Quality Technology Conference* (pp. 525-527). Denver. Colorado: American Water Works Association.
- Geldreich, E.E. (1978). Bacterial populations and indicator concepts in feces, sewage, storm water and solid waste. En: Berg, C. (ed.). Indicators of viruses in water and food. *Ann Arbor.*, 2 (1), 12-16.
- Gerba, C.P. (2000). Indicator microorganisms. En: Maier, R.M.I., L. Pepper y C.P. Gerba (eds.). *Environmental Microbiology* (pp. 491-503). Salt Lake City: Academic Press.
- Gerba, C.P. y I. Pepper. (2006). Microbial contaminants. En: Maier, R.M.I., L. Pepper y C.P. Gerba (eds.). *Environmental Microbiology* (pp. 144-169). Salt Lake City: Academic Press.
- Haile, R.W., J.S. Witte, M. Gold, R. Cressey, C. McGee, R.C. Millikan, A. Glasser y N. Harawa. (1999). The health effects of swimming in ocean water contaminated by storm drain runoff. *Epidemiology*, 40 (10): 355-363.
- Havelaar, A., U.J. Blummenthal, M. Strauss, D. Kay y J. Bartram. (2001). Guidelines the current position. En: Fewtrell, L. y J. Bartram (eds.). *Water quality: Guidelines, standards and health* (pp. 17-41). World Health Organization Water Series. Londres, Inglaterra: IWA Publishing.
- Hunt, M.E. y E.W. Rice. (2005). Microbiological examination. En: Eaton, A.D., L.S. Clesceri, E.W. Rice y A.E. Greenberg (eds.). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. (21^a ed.). EE. UU.: American Public Health Association.
- Kay, D., A.F. Fleisher, F. Godfree, R.L. Jones, R. Salmon, M.D. Shore y R. Zelenkauch Jacquotte. (2001). Predicting likelihood of gastroenteritis from sea bathing: results from randomized exposure. *The Lancet*, 10 (44): 905-909.
- Morinigo, M.A., R. Cornax, M.A. Muñoz, P. Romero y J. Borrego. (1990). Relationships between *salmonella spp.* and indicator microorganisms in polluted natural waters. *Water Research*, 10 (24): 117-120.
- Palombo, A.J. (2000). Valores hídricos vs. el valor del agua. En: Donoso, M.C., M. Donoso y M.P. Cornejo de Grunauer (eds.). *Entendimiento de una omisión histórica y aplicabilidad de mercados del agua en Panamá: Gestión integrada de los recursos hídricos en las Américas*. Panama: Banco de Desarrollo Agropecuario.
- Parra, O., C. Valdovinos, E. Habit y R. Figueroa. (2004). *Programa de monitoreo de la calidad del agua del sistema río Biobío. Informe Técnico*. Chile: Centro de Ciencias Ambientales EULA.
- Quintero, E. y J. Castillo. (2010). *Evaluación de bacterias heterótrofas de tanques de almacenamiento*. Tesis. Centro Regional Universitario de Azuero, Universidad de Panamá, Panamá.
- Reynolds, A. (2001). Water quality-detection and enumeration of coliform organism, thermotolerant coliform organism and presumptive *Escherichia coli*. Multiple tube (most probable number) method. ISO 9308-2. Geneva, Switzerland.

- Sartory, D. y L. Howard. (1992). A medium detecting B-glucoronidase activity and lactose fermentation for the simultaneous detection of *Escherichia coli* and coliformes in water. *Letters in Applied Microbiology*, 15 (1): 273-276.
- Toranzos, G.A. y G.A. Feter. (1997). Detection of indicator microorganisms in environmental freshwater and drinking waters. *Environmental Microbiology*, 23 (2): 184-194.
- Townsend, S. (1992). The relationships between salmonellas and fecal indicator concentration in two pool in the Australian. *Journal of Applied Bacteriology*, 2 (730): 82-188.
- Zumaeta, A.M. (2002). *Evaluación de riesgos para la salud por el uso de aguas residuales. Aspectos biológicos de la calidad de agua*. Lima, Perú: Cepis/OPS.

Agradecimientos

Agradecemos de manera extensiva la colaboración y apoyo logístico del Laboratorio de Calidad de Agua del Ministerio de Salud de la provincia de Los Santos, así como a la Unidad de Investigación del Centro Regional Universitario de Azuero.