



**ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL**

**Facultad de Ingeniería Marítima, Ciencias Biológicas, Oceánicas y Recursos  
Naturales**

**“Diseño de un Sistema de Depuración para Concha Prieta usando Acido Láctico  
como Agente Antimicrobiano”.**

## **TESIS DE GRADO**

**Previa a la Obtención del Título de:**

**INGENIERO ACUICULTOR**

**Presentada por:**

**Michelle Dennisse Quinteros Ramos  
Luis Alberto Zea Vidal**

**Guayaquil – Ecuador**

**Año – 2012**

## **AGRADECIMIENTO**

A nuestros padres por el apoyo que nos brindaron durante todo este proceso, al M.Sc. Víctor Osorio, Director de Tesis, por su ayuda invaluable e incondicional, y a todas las personas que de una u otra forma estuvieron presentes tanto con su colaboración como con su apoyo para la realización de este trabajo.

## **DEDICATORIA**

**DIOS Y NUESTROS PADRES**

**TRIBUNAL DE GRADUACIÓN**

---

**M.Sc. Jerry Landivar**  
**DECANO DE LA FIMCM**  
**PRESIDENTE**

---

**M.Sc. Víctor Osorio**  
**DIRECTOR DE TESIS**

---

**PhD. Marcelo Muñoz**  
**Evaluador**

---

**PhD. Alba Calles**  
**Evaluador**

## **DECLARACIÓN EXPRESA**

**“La responsabilidad del contenido de esta Tesis de Grado, nos corresponden exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL”**

**(Reglamento de Graduación de la ESPOL).**

---

**Michelle Quinteros Ramos**

---

**Luis A. Zea Vidal**

## **RESUMEN**

Los bivalvos son acarreadores potenciales de microorganismos patógenos (virus y bacterias), como consecuencia de su mecanismo de alimentación por filtración, por medio del cual son capaces de concentrar aquellos microorganismos presentes en su hábitat natural (Madden et al. 1986). Por lo tanto, al igual que para otros bivalvos, hay una relación estrecha entre su calidad microbiológica y la calidad de las aguas en que viven (Fernández et al. 1977).

Dado que las conchas se encuentran altamente contaminadas y se consumen normalmente crudas, éstas constituyen una fuente potencial de enfermedad para la población, y por lo tanto, resulta muy importante estudiar alternativas que permitan mejorar la calidad microbiológica de estos mariscos. Una de ellas es la depuración microbiológica, que consiste en un método que se utiliza ampliamente en países que cultivan moluscos en gran escala, con el fin de mejorar su calidad sanitaria si han sido cosechados de zonas contaminadas (Cantelmo y Carter 1992).

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

Este proceso requiere de equipo especializado de alto costo, pues para tratar el agua y lograr eliminar la contaminación en ella, se utilizan filtros de ozono, filtros de cloro,

rayos ultravioleta u otros agentes , además de las instalaciones necesarias para lograr un sistema continuo (Blagoslawski et al. 1983). Como se deduce, estas condiciones no son compatibles con la forma artesanal en que se realiza la cosecha de concha en el país, ni con las condiciones de las familias que se encargan de realizar su comercialización.

Por lo anterior, en esta investigación se planteó el objetivo general de establecer un método de depuración que mejore la calidad microbiológica de la concha prieta, de manera que cumpla con la norma internacional de calidad microbiológica para estos bivalvos, además de que no afecte sus características organolépticas. Se buscó definir un sistema estacionario, asequible a la población que actualmente realiza la explotación de este molusco. En el sistema estacionario, el agua que se utiliza en el tanque contiene un agente bactericida que elimine los microorganismos expulsados durante el proceso de filtración de manera que no haya recontaminación, al no existir un gran flujo de agua y se lleve a cabo el proceso de arrastre.

En este caso, y con base en los resultados de Wong et al. (1996), se decidió evaluar la utilización de ácido láctico como agente bactericida para el sistema estacionario.

El ácido láctico, por otra parte, no es tóxico para el ser humano, su efecto bactericida por disminución de pH es muy efectivo, y aumenta en presencia de sal, por lo que es ampliamente utilizado en productos marinos (Lueck 1985).

Para conseguir la concentración más apta para el sistema de depuración es necesario hacer algunos ensayos para tener un estimado ya que no existe bibliografía que sustente dichos datos. Los análisis iniciales se hicieron en el laboratorio de Biología de FIMCBOR para obtener un estimado; en base a los cuales se realizaron los ensayos definitivos del sistema en la Comunidad de Costa Rica (El Oro), usando el agua y molusco del sector.



## INDICE GENERAL

Pág.

### RESUMEN

INDICE GENERAL.....	I
ABREVIATURAS.....	VI
INDICE DE GRAFICOS.....	VII
INDICE DE TABLAS.....	VIII
TERMINOS Y DEFINICIONES.....	IX
INTRODUCCIÓN.....	1

### 1. ANTECEDENTES

1.1 Características Generales de la Concha Prieta ( <i>A. tuberculosa</i> ).....	3
1.1.1 Sistemática y Taxonómica.....	3
1.1.2 Distribución Geográfica.....	4
1.1.3 Morfología y Anatomía.....	5
1.1.4 Reproducción.....	8
1.1.5 Alimentación.....	10
1.1.6 Tasa de Filtración.....	11
1.1.7 Hábitat.....	12

<b>1.2 Generalidades del Acido Láctico y Antecedentes de su uso en diferentes Industrias.....</b>	<b>13</b>
<b>1.2.1 Propiedades y características.....</b>	<b>14</b>
<b>1.2.2 Importancia Biológica.....</b>	<b>15</b>
<b>1.2.3 Nomenclatura.....</b>	<b>17</b>
<b>1.2.4 Propiedades Físicas y Químicas.....</b>	<b>17</b>
<b>1.2.5 Aplicaciones y usos.....</b>	<b>18</b>
<b>1.2.6 Industria acuícola.....</b>	<b>18</b>
<b>1.2.7 Industria avícola.....</b>	<b>19</b>
<b>1.2.8 Modo de acción.....</b>	<b>21</b>
<b>2. MATERIALES Y METODOS</b>	
<b>2.1 Descripción y Datos Importantes del Lugar Captura.....</b>	<b>23</b>
<b>2.1.1 Sitio de captura.....</b>	<b>23</b>
<b>2.1.2 Métodos de captura de los organismos.....</b>	<b>25</b>
<b>2.1.3 Tamaño de captura.....</b>	<b>26</b>
<b>2.1.4 Datos estadísticos de captura.....</b>	<b>27</b>
<b>2.1.5 Periodos de veda en el país .....</b>	<b>27</b>
<b>2.2 Materiales y Métodos de Análisis Microbiológicos.....</b>	<b>29</b>
<b>2.2.1 Enumeración de Coliformes y <i>E. coli</i> como indicadores microbiológicos.....</b>	<b>29</b>
<b>2.2.2 Método para el Recuento de <i>E. coli</i> / Coliformes.....</b>	<b>32</b>

<b>2.3</b>	<b>Diseño.....</b>	<b>33</b>
2.3.1	Diseño del sistema de depuración.....	33
2.3.2	Instalación del sistema.....	34
2.3.3	Sistema de toma y distribución del agua .....	36
2.3.4	Filtro de sólidos .....	37
2.3.5	Sistema de desinfección del agua con Ac. Láctico.....	38
<b>2.4</b>	<b>Operación del Sistema.....</b>	<b>38</b>
2.4.1	Preparación de los tanques.....	38
2.4.2	Muestreo inicial microbiológico.....	38
2.4.2.1	Protocolo de Ensayo Microbiológico utilizado en Laboratorio FIMCBOR.....	38
2.4.2.2	Ensayo Inicial con Concentraciones De Ácido Láctico En Agua De Pto. Hondo (Guayas).....	40
2.4.2.3	Bioensayo en <i>Anadara Tuberculosa</i> De Pto. Hondo (Guayas).....	43
2.4.3	Tiempo de Inmersiones: Determinación para cada concentración de Acido Láctico.....	44
2.4.3.1	Determinación de Concentración y Tiempo de Ácido Láctico en el agua de Costa Rica (El Oro).....	44
2.4.3.2	Determinación De Tiempo De Inmersión De Concha Prieta En Agua Con Ácido Láctico.....	45
2.4.4	Manejo de los moluscos en el sistema.....	46

2.4.5	Control de parámetros: Salinidad, Temperatura, pH, concentraciones microbiológicas.....	48
2.4.6	Drenado de los recipientes y cosecha de los moluscos.....	48
2.4.7	Limpieza de las bandejas depuradoras.....	49
2.4.8	Muestreo microbiológico y análisis comparativos.....	50
2.4.9	Estadísticas de las pruebas.....	51
2.4.10	Análisis Sensorial post – depuración.....	52
3.	<b>ANALISIS DE FACTIBILIDAD EN EL MERCADO</b>	
3.1	Análisis Oferta-Demanda.....	53
3.2	Definición del Mercado Meta.....	53
3.3	Análisis de Precios, Canales de Comercialización y Competencia.....	54
4.	<b>RESULTADOS</b>	
4.1	Ensayo Inicial Con Concentraciones De Ácido Láctico En Agua de Pto. Hondo (Guayas).....	56
4.2	Bioensayo Inicial en <i>Anadara tuberculosa</i> de Pto. Hondo (Guayas).....	59
4.3	Determinación de Concentración y Tiempo de Ácido láctico en el Agua de Costa Rica (El Oro).....	60
4.4	Determinación De Tiempo De Inmersión De Concha Prieta En Agua Con Ácido Láctico en Costa Rica (El Oro).....	65
4.5	Características Organolépticas Post – Depuración.....	69

<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>71</b>
<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>73</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....</b>	<b>74</b>

**ABREVIATURAS**

<b>L/h</b>	1 litro por cada hora
<b>G/ml</b>	Gramo por mililitro
<b>°C</b>	Grados centígrados
<b>G/cm<sup>3</sup></b>	Gramo por centímetro cúbico
<b>Ppm</b>	Partes por millón
<b>u</b>	Micra
<b>ul</b>	Micro litro
<b>g/lt</b>	Gramo por litro
<b>mg/lt</b>	Miligramo por litro
<b>ml/lt</b>	Mililitro sobre litro
<b>UFC</b>	Unidades formadoras de colonias
<b>pH</b>	Medida de la cantidad de partículas de Hidrogeno
<b>INP</b>	Instituto Nacional de Pesca
<b><i>E. coli</i></b>	Echerichia coli
<b>APPCC</b>	Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos
<b>Hp</b>	Caballos de Fuerza
<b>PVC</b>	Cloruro de polivinilo

## INDICE DE GRAFICOS

<b>Figura 1.</b>	Distribución geográfica de <i>A. tuberculosa, similis, y grandis</i> .....	3
<b>Figura 2.</b>	Vista exterior e interior de las valvas de <i>Anadara tuberculosa</i> .....	4
<b>Figura 3.</b>	Parte de una pila de <i>A. tuberculosa</i> .....	6
<b>Figura 4.</b>	Esquema del Ciclo de Vida de la <i>Anadara tuberculosa</i> .....	8
<b>Figura 5.</b>	Zona de costa rica, Jambelí.....	11
<b>Figura 6.</b>	Estructura molecular Ac. Láctico.....	13
<b>Figura 7.</b>	Corrales de engorde de concha prieta Costa Rica.....	24
<b>Figura 8.</b>	Áreas recolectoras de <i>A. tuberculosa</i> en Ecuador.....	24
<b>Figura 9.</b>	Instalación del Sistema de Depuración Isla Costa Rica.....	35
<b>Figura 10.</b>	Toma de agua para el sistema (bomba de agua de mar 1 Hp)....	36
<b>Figura 11.</b>	Distribución del agua bombeada en el sistema.....	36

## INDICE DE TABLAS

<b>TABLA I</b>	<b>Generalidades del Acido Láctico.....</b>	<b>15</b>
<b>TABLA II</b>	<b>Pruebas de ácido láctico a 10, 20, 25 ppm en agua de Pto. Hondo (Guayas).....</b>	<b>56</b>
<b>TABLA III</b>	<b>Pruebas de ácido láctico a 30 ppm en Guayas.....</b>	<b>57</b>
<b>TABLA IV</b>	<b>Pruebas de ácido láctico a 40 ppm en Guayas.....</b>	<b>58</b>
<b>TABLA V</b>	<b>Pruebas en Anadara tuberculosa de Pto. Hondo.....</b>	<b>59</b>
<b>TABLA VI</b>	<b>Resultados recuento de Coliformes Totales a 35 ppm.....</b>	<b>61</b>
<b>TABLA VII</b>	<b>Resultados recuento de Coliformes Totales a 40 ppm.....</b>	<b>62</b>
<b>TABLA VIII</b>	<b>Resultados recuento de Coliformes Fecales 35 ppm.....</b>	<b>63</b>
<b>TABLA IX</b>	<b>Resultados recuento de Coliformes Fecales 40 ppm.....</b>	<b>64</b>
<b>TABLA X</b>	<b>Tiempo de inmersión Sector A (Costa Rica).....</b>	<b>66</b>
<b>TABLA XI</b>	<b>Tiempo de inmersión Sector B.....</b>	<b>67</b>
<b>TABLA XII</b>	<b>Tiempo de inmersión Sector C.....</b>	<b>69</b>



## TERMINOS Y DEFINICIONES

**Agua de mar limpia:** El agua marina o salobre a utilizar en las condiciones establecidas durante un proceso de depuración, exenta de contaminación microbiológica y de compuestos tóxicos o nocivos de origen natural o presentes en el medio ambiente, en cantidades que puedan influir negativamente en la calidad sanitaria de los moluscos bivalvos.

**Características organolépticas:** Características propias del moluscos que indican su textura, color, olor y sabor antes y después de un proceso.

**Depuración:** Disposición de estanques con agua limpia de mar, de manera natural o depurada, mediante un tratamiento adecuado, en los que se mantienen a los moluscos bivalvos vivos durante el tiempo necesario para que puedan eliminar las sustancias contaminantes microbiológicas con el fin de convertirlos en aptos para el consumo humano.

**Detritus:** Materia orgánica muy finamente dividida.

**Esfuerzo de captura:** Numero de personas que recolectan moluscos vivos por uno u otro medio en una zona de recolección, para su tratamiento y/o puesta en el mercado.

**Factor de condición:** Condiciones del hábitat del animal y los efectos de estas condiciones en su desarrollo.

**Índice de engorde:** Relación entre la talla y peso del molusco y las condiciones en que se desarrolla y vive.

**Moluscos bivalvos:** Los moluscos lamelibranquios que se alimentan por filtración.

**Patógenos:** Agentes que causan cambios adversos a los individuos que los poseen.

**Pesquería:** Proceso de captura de los moluscos en su hábitat.

**Reclutamiento:** Etapa del ciclo de *A. tuberculosa* en que los juveniles se unen a las conchas adultas para empezar su desarrollo en el medio.

## INTRODUCCION

La concha prieta *Anadara tuberculosa* (Sowerby, 1833) es un molusco bivalvo distribuido a lo largo de la costa del Océano Pacífico, desde Baja California (USA) hasta Tumbes (Perú). Esta especie es utilizada por las comunidades aledañas como fuente de alimentación y subsistencia. Las capturas de *Anadara spp.* se han incrementado geométricamente con el tiempo.

Esto es aún más relevante si se toma en cuenta que el esfuerzo de captura incrementa cada año. Se menciona que el deterioro de la calidad de agua de los ecosistemas estuarinos, se ve reflejada en el producto lo cual atenta contra su calidad.

Esta situación indica la necesidad de establecer normas y leyes para regular el grado de contaminación de las zonas de recolección así como un control sanitario al producto antes de su venta.

La concha prieta es la principal fuente de alimentación, trabajo e ingresos en la comunidad de la isla Costa Rica localizada en el Archipiélago de Jambelí, provincia de El Oro, fronterizo con Perú; es por esta razón que se quiere obtener el sistema de depuración más idóneo y adecuado, usando ácido láctico, para lograr darle un valor agregado a este molusco y a su vez, que la comunidad lo desarrolle y obtenga beneficios significativos.

El control sanitario de moluscos destinados al consumo se basa en la determinación de los niveles de coliformes fecales y *Escherichia coli*, y cualquier otro tipo de agentes patógenos presentes en su tracto digestivo, en la carne y líquido intervalvar de los moluscos en las aguas de cultivo, para lo cual la utilización de un sistema de depuración nos garantiza que el molusco esté libre de cualquier elemento contaminante.

El uso de ácido láctico como desinfectante para el sistema de depuración es debido a que en las zonas rurales como es el caso de la isla Costa Rica, no se cuenta con la disponibilidad de energía eléctrica suficiente para usar otros métodos de desinfección del agua como el ozono o rayos ultravioleta.

El ácido láctico es utilizado como preservante de materias primas por poseer propiedades acidificantes, anti fúngicas y bactericidas.

Con esto se pretende lograr que el producto sea distribuido como un producto inocuo y con un mejor precio en el mercado local y fomentar su desarrollo como una alternativa para los cultivos acuícola.

## 1. ANTECEDENTES

### 1.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA ESPECIE

#### 1.1.1 Sistemática y Taxonómica

**Reino:** Animalia

**Filo:** Molusca

**Clase:** Bivalvia

**Subclase:** Pteriomorpha

**Orden:** Arcoida

**Superfamilia:** Arcacea

**Familia:** Arcidae

**Género:** Anadara (Gray, 1847)

**Especie:** tuberculosa

La especie *A. tuberculosa* en su área de distribución se identifica con los siguientes nombres comunes: Costa Rica (Piangua), Colombia (Piangua hembra o Piangua), México (Pata de Mula, Almeja de Sangre), El Salvador (Curil o Concha negra), Guatemala, Honduras, Nicaragua y Perú (Concha negra), Ecuador (Concha prieta o Negra), Panamá (Chucheca o Concha prieta).

### 1.1.2 Distribución Geográfica

Conchas de manglar del genero *Anadara spp.*, son cosechadas por gran numero de pescadores artesanales a lo largo de toda la costa Oeste del continente americano iniciando su distribución desde Baja California pasando por América Central hasta llegar a Perú.

El rango geográfico de *A. tuberculosa* va desde Laguna Ballena, Baja California Sur, México, hasta Bahía de Tumbes, Perú (Keen, A. 1971; Mora Sánchez 1990; Cruz y Jiménez, 1994).

La extensión de esta distribución alberga unos 6350 Km. a lo largo de las costas del Pacífico, donde precisamente son los moluscos con mayor abundancia e importancia comercial de esta línea costera.

Tres especies son cosechadas a mano, en orden de abundancia estas son: *A. tuberculosa*, *A. similis* y *A. grandis*.

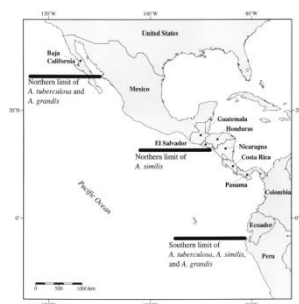


Figura 1. – Rango distribución geográfica de las conchas *A. tuberculosa*, *A. similis*, y *A. grandis*, en las ciudades en las cuales son colectadas.

### 1.1.3 Morfología y Anatomía

*A. tuberculosa* es un molusco de cuerpo blando encerrado entre dos cubiertas duras llamadas valvas; las cuales están unidas por una serie de dientes que hacen la función de una bisagra, permitiendo así que las valvas se abran y cierren.

Las conchas son grandes y ovaladas, relativamente gruesas. Las valvas muestran entre 33 y 37 costillas, con los márgenes dorsales angulados. Los nódulos o tubérculos de las costillas son la razón del nombre de la especie. Su área cardinal es angosta. Longitud 56mm, altura 42mm, diámetro 40mm.

Su color es blanco, cubierto por un periostraco piloso que va desde café oscuro hasta negro. Posee umbos anchos y prominentes. La sangre de *A. tuberculosa* es negra.

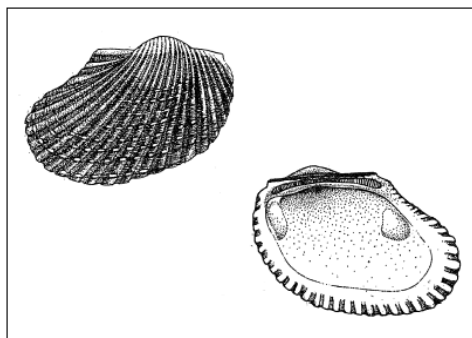


Figura 2.- vista exterior e interior de las valvas de *Anadara tuberculosa* (por Mora Sánchez, 1990)

El cuerpo o masa visceral contiene los órganos esenciales para la vida del animal, tales como los de digestión, excreción y reproducción. Posee dos músculos aductores,

que controlan el movimiento de las valvas: el pequeño es el anterior y el grande el posterior.

Cuando ingerimos la concha, lo hacemos con todos sus órganos, pero esto no es dañino; por lo que no hay que desviscerarla como se lo hace con el pescado y cangrejo.

La parte inferior de la masa visceral que tiene forma de hacha y color anaranjado recibe el nombre de *pie*, el cual le sirve para moverse.

Pegadas a las valvas encontramos al manto, el cual tiene la importante función de formar las valvas.

*A. tuberculosa* al igual que los peces, respiran por dos pares de branquias que se encuentran a cada lado del cuerpo. Las branquias le sirven para respirar en el agua. Sin embargo, las conchas pueden sobrevivir hasta ocho días fuera del agua, siempre que sus branquias estén húmedas. Esto permite que se las encuentre vivas en el mercado.



*A. tuberculosa* crece ligeramente más rápido que *A. similis*, y en pruebas científicas, ambas crecen rápido si constantemente son sumergidas en agua (Bravo y Abarca, 1999).

El porcentaje de carne seca en *A. tuberculosa* en un rango de longitud de 42 – 47.5 mm es de 20%; en el rango de 54 – 59.5 mm (cuando la valva se ensancha), es de 16%; y en general para todas las tallas existe un promedio de 18% (Cruz y Palacios, 1983). Squires et al. (1975) decía que el peso de la carne húmeda de *A. tuberculosa* era 36% del peso total de tallas pequeñas (36-42 mm) y ligeramente un 15% más en tallas grandes.

Squires *et al.* (1975), no encontraron una relación definida entre la madurez sexual y el peso de las partes blandas de la especie. Cruz (1982), determinó una gran relación entre el índice de condición y la madurez.

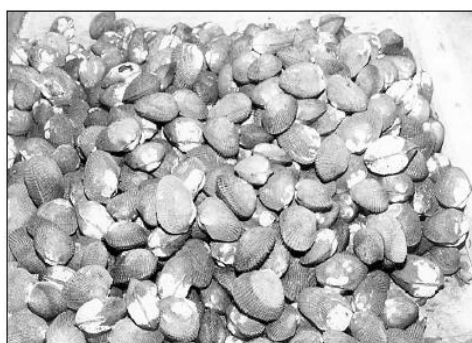


Figura 3.- parte de una pila de *A. tuberculosa*,  
La concha más grande es de 60 mm aprox.

#### 1.1.4 Reproducción

La concha prieta se reproduce durante todo el año por fertilización externa del óvulo, pero la época principal de maduración es en noviembre y febrero. Diferentes autores mencionan que estas fechas pueden estar influidas por la temporada de lluvias, la salinidad y las temperaturas en las especies; después de la eclosión las larvas son planctónicas y su desarrollo transcurre entre 23 y 31 días en aguas oceánicas; durante este período se han podido identificar 4 fases:

*Trocófora*.- presenta una talla de 0.08 mm y una duración de un día.

*Veliger* o charnela recta.- presenta una talla de 0.108 mm, y su duración se estima entre 7 y 10 días.

*Larva con umbo*.- cuya talla es de 0.16 mm y presenta una duración entre 3 y 5 días.

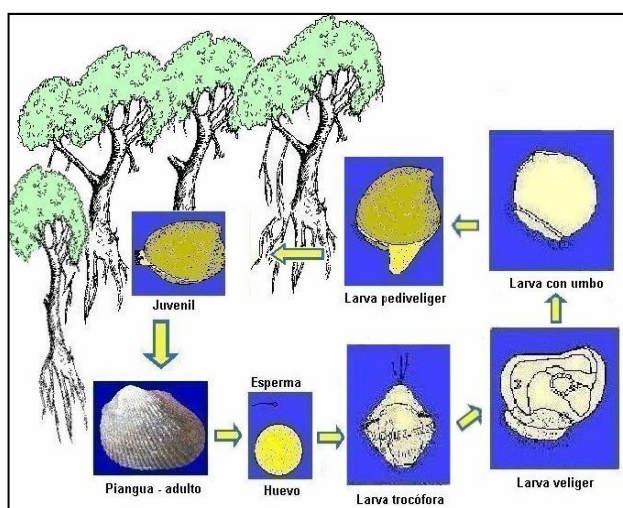
Y por último la larva oculada o pediveliger.- Tiene una talla de 0.272 mm y permanece en la columna de agua entre 13 y 15 días.

Este último estadio retorna a las áreas de manglar, con ayuda de las corrientes y de los cambios de marea, y se asientan previamente como postlarva (5.5 mm y una duración entre 4 y 5 meses) a un sustrato para posteriormente vivir aisladas.

Los juveniles (entre 18 y 30 mm) tienen una duración de 6 meses y el reclutamiento a la pesquería se inicia entre los 6 y los 10 meses posteriores al desove.

El ciclo estacional de los juveniles es muy variable, pero se observó un período de máximo reclutamiento en los meses de mayo, agosto y diciembre en los sustratos del manglar. Razón por la cual, los juveniles de *A. tuberculosa* son encontrados atados por hilos a las conchas adultas y a las raíces del mangle especialmente desde julio hasta Septiembre.

La talla de primera de reproducción (44 mm) se alcanza a los 12 meses y a partir de aquí son considerados adultos, y duran 4 años en la pesquería.



*Fig. 4. Esquema general del Ciclo de Vida de la Anadara tuberculosa. Los estadios no guardan proporción entre sí, a fin de que se pueda observar cada fase.*

Cruz (1982), determinó una gran relación entre el índice de condición y la madurez. Rengifo (1985), estableció que en condiciones de cautividad prolongada, el estrés causado por el almacenamiento puede alterar notablemente la calidad del producto,

especialmente en relación con el índice de engorde, o con el factor de condición, lo cual entorpecería el establecimiento de la relación existente, entre la madurez y el factor de condición.

### **1.1.5 Alimentación**

La concha es un filtrador: absorbe agua por la boca, retiene el alimento como un cedazo, y luego expulsa el agua; es por esta razón que se alimenta principalmente de detritus, y algas microscópicas.

Cuando sube la marea (pleamar) y el lodo se inunda, la concha abre las valvas y empieza a comer. Al bajar la marea cierra las valvas y espera la próxima pleamar para volver a comer.

*A. tuberculosa* posee la capacidad de filtrar hasta 50 litros de agua por día (Martínez *et al.* 1991).

Los virus de aguas negras cuando son ingeridos por bivalvos son atrapados en la mucosa de las agallas y transportados por movimientos ciliares a la boca y luego al estómago.

Aunque los virus de animales de sangre caliente no se replican en bivalvos, los virus pueden ser digeridos por enzimas, transportados protegidos por macrófagos hacia la musculatura o ser eliminados por las heces (Campos 1990, Martínez *et al.* 1991).

De esta manera los bivalvos pueden actuar como concentradores tanto de bacterias, aumentando así las posibilidades de infección a la hora de consumirlos crudos o mal cocinados.

#### **1.1.6 Tasa de Filtración**

De acuerdo a los datos expuestos en un estudio de la biología de la *Anadara tuberculosa*; Es notoria en la curva la presencia de dos mínimos y dos máximos para la tasa de filtración. La hora de medida para los dos mínimos fue la misma (9pm a 5am), al igual que para los dos máximos (1pm a 9pm), y es coherente además con lo que plantean Madrigal et al. (1985), quienes afirman que la tasa de filtración de los bivalvos disminuye conforme disminuye la temperatura en su hábitat y viceversa.

La temperatura mínima encontrada en el estudio (15°C) correspondió al período de las 9pm a las 5am en donde la tasa de filtración fue mínima, y la temperatura máxima (28°C) correspondió al período en el que la tasa de filtración fue máxima, es decir de 1pm a 9pm.

Adicionalmente, las tasas de filtración encontradas para las conchas, entre 1.43 y 3.27 l/h, son coherentes en magnitud con las que informan para otros géneros de bivalvos. Madrigal et al. (1985) encontraron una tasa máxima de 4.5 l/h para el ostión de manglar, y Fernández y Brunker (1977) afirman que la tasa de filtración promedio de los bivalvos es de 2.08 l/h.

### 1.1.7 Hábitat

*A. tuberculosa* habita en niveles de sedimentos lodosos en manglares pantanosos que se encuentra a lo largo del continente e islas. *A. tuberculosa* se encuentra entre las raíces de los árboles de manglar; a 15 cm. de profundidad en el lodo (desde la punta del dedo hasta la muñeca); en las capas intersticiales de lodo entre el mangle y la línea baja de marea (Rosero, 1999).



Figura 5.- zona de costa rica, Jambelí

*A. tuberculosa* es muy abundante en las zonas de mangle rojo, *Rhizophora mangle*, mientras la densidad es mucho menor en zonas de mangle negra, *Avicenia germinans*,

donde los sedimentos son muy compactos y tienen más fibras leñosas; nunca se la encuentra en arena.

*A. tuberculosa* probablemente es muy abundante en los pantanos de mangle debido a que las raíces de estos árboles le ofrecen cobertura de los predadores.

El fondo se compone principalmente de fango, materia orgánica en descomposición y arena, que junto al aporte de los ríos le otorgan a las aguas una elevada productividad, una baja transparencia y acrecentados índices de sedimentación (Gallo y Vargas, 1975).

El clima en el área es ecuatorial húmedo, la temperatura promedio es de 26,2°C con una máxima de 30°C en abril y una mínima de 21.3°C en septiembre. La humedad relativa es del 84%, la precipitación promedio es de 2105 mm/ año.

## **1.2 GENERALIDADES DEL ACIDO LACTICO Y ANTECEDENTES DE SU USO EN DIFERENTES INDUSTRIAS.**

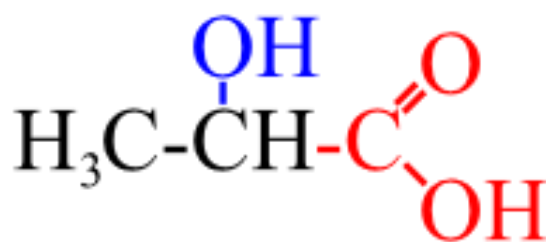
### **1.2.1 Propiedades y características**

El **ácido láctico** (Del lat. *lac, lactis*, leche), también conocido por su nomenclatura oficial **ácido 2-hidroxi-propanoico** o **ácido  $\alpha$ -hidroxi-propanoico**, es un compuesto

químico que juega importantes roles en diversos procesos bioquímicos, como la fermentación láctica. Es un ácido carboxílico, con un grupo hidroxilo (dibujado en azul) en el carbono adyacente al grupo carboxilo (dibujado en rojo), lo que lo convierte en un ácido  $\alpha$ -hidroxílico (AHA) de fórmula  $\text{H}_3\text{C}-\text{CH}(\text{OH})-\text{COOH}$ . En solución puede perder el protón y convertirse en el anión lactato.

El ácido láctico es un quirómero, por lo que posee dos isómeros ópticos. Uno es el dextrógiro ácido D-(-)-láctico o d-ácido láctico (en este caso, el ácido (R)-láctico)]; el otro es el levógiro ácido L-(+)-láctico o  $\ell$ -ácido láctico (en este caso, ácido (S)-láctico), que es el que tiene importancia biológica.

La mezcla racémica (cantidades idénticas de estos isómeros) se llama d, $\ell$ -ácido láctico.



*Figura 6. Estructura molecular Ac.*

*Láctico*



General	
Nomenclatura IUPAC	ácido 2-hidroxi-propanoico
Otros nombres	Ácido láctico Ácido $\alpha$ -hidroxi-propanoico
Formula desarrollada	$\text{H}_3\text{C}-\text{CH}(\text{OH})-\text{COOH}$
Formula empírica	$\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_2$
Masa molecular	90.08 g/mol
Número CAS	[50-21-5] L:[79-33-4] D:[10326-41-7] D/L:[598-82-3]

*TABLA I. Generalidades del Ácido láctico*

### 1.2.2 Importancia Biológica

El **ácido L-láctico** se produce a partir del piruvato a través de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en procesos de fermentación. El lactato se produce

constantemente durante el metabolismo y sobre todo durante el ejercicio, pero no aumenta su concentración hasta que el índice de producción no supere al índice de eliminación de lactato. El índice de eliminación depende de varios factores, como por ejemplo: transportadores monocarboxilatos, concentración de LDH y capacidad oxidativa en los tejidos. La concentración de lactatos en sangre usualmente es de 1 o 2 mmol/l en reposo, pero puede aumentar hasta 20 mmol/l durante un esfuerzo intenso.

El aumento de la concentración de lactatos ocurre generalmente cuando la demanda de energía en tejidos (principalmente musculares) sobrepasa la disponibilidad de oxígeno en sangre. Bajo estas condiciones la piruvato deshidrogenasa no alcanza a convertir el piruvato a acetil~CoA lo suficientemente rápido y el piruvato comienza a acumularse. Esto generalmente inhibiría la glucólisis y reduciría la producción de Adenosín Trifosfato (ATP, sirve para acumular energía), si no fuera porque la LDH reduce el piruvato a lactato:



El proceso de la producción de lactato es regenerar la di nucleótido adenina nicotinamina ( $\text{NAD}^+$ ) necesario para la glucólisis y entonces para que continúe la producción de ATP.

El incremento de lactato producido puede eliminarse de diversas formas: la oxidación a piruvato en las células musculares bien oxigenadas, que es usado directamente para completar el ciclo de Krebs y convertir la glucosa a través del ciclo de Cori.

La fermentación de ácido láctico también la produce las bacterias Lactobacillus. Estas bacterias pueden encontrarse en la boca, y puede ser el responsable de la creación de caries.

### 1.2.3 Nomenclatura

- Oficial: Ácido 2-hidroxi-propanoico o ácido  $\alpha$ -hidroxi-propanoico
- Usual: Ácido láctico

### 1.2.4 Propiedades Físicas y Químicas

- |   |  |
|---|--|
| ➤ Estado Físico                             | Aceitoso   |
| ➤ Presentación                              | Líquido siruposo, límpido y libre<br>De material en suspensión |
| ➤ Concentración                             | 87,5-88,5%   |
| ➤ Peso específico a 20°C                    | 1,20-1,22 g/ml   |
| ➤ Sabor                                     | Ácido y característico   |
| ➤ Olor                                      | Característico y agradable                                     |
| ➤ Valor pH a 10g/l H <sub>2</sub> O-(20 °C) | 2.8  |

➤ Viscosidad dinámica (20 °C)	20 – 40 mPa*s
➤ Punto de fusión	18 °C
➤ Punto de ebullición (20 hPa)	122 °C
➤ Temperatura de ignición	no combustible
➤ Punto de inflamación	no inflamable
➤ Presión de vapor (25 °C)	0.1 hPa
➤ Densidad (20 °C)	1.21 g/cm <sup>3</sup>
➤ Solubilidad en agua (20 °C)	fácilmente soluble

### **1.2.5 Aplicaciones y usos**

- Alimento para niños.
- Purgante, en la forma de lactato de calcio o lactato de magnesio.
- Removedor de sales de calcio.
- Como mordente.
- Curtimiento de pieles.
- Materia prima para síntesis orgánica.

### **1.2.6 Industria Acuícola**

En lo que respecta a la prevención de enfermedades y a la inmuno-modulación del camarón se han usado, entre otras, combinaciones de bacterias productoras de ácido láctico y de levaduras orientadas a mejorar la salud del tracto intestinal y el estado

general del animal. Estos compuestos actúan en el contexto de la exclusión competitiva.

### **1.2.7 Industria avícola**

Los ácidos orgánicos son utilizados como preservantes de materias primas (propiedades anti fúngicas y bactericidas). Todos ellos combinan las propiedades conservantes y acidificantes. Además, la presencia de estos ácidos orgánicos podría reducir la formación de amonio en el estómago, al evitar la desaminación de los aminoácidos a este nivel.

Trabajos recientes indican que la inclusión de ácidos orgánicos mejora la actividad de las enzimas exógenas, lo que contribuiría indirectamente a mejorar la digestibilidad del pienso.

Los ácidos orgánicos son sustancias fácilmente metabolizables, con valores en energía superiores en general al de los cereales. Son productos intermedios del metabolismo animal y, en muchos casos, productos finales de la fermentación de los hidratos de carbono por los microorganismos.

El Centro Tecnológico de la Industria Cárnica de La Rioja (CTIC) ha presentado un estudio sobre, “Eficacia del ácido láctico como descontaminante en muslos de

pollos refrigerados”, cuyo fin es comprobar la eficacia del ácido láctico como descontaminante de microorganismos en carne de pollo.

Según los responsables de este trabajo, la carga microbiana que presentan actualmente los canales de pollo comerciales comprometen la calidad sanitaria y limita el periodo de vida útil del producto.

Los resultados han dependido de la concentración de ácido láctico aplicada sobre la carne y el tiempo de contacto, encontrándose el mejor resultado en los muslos de pollo que se sumergieron en una solución de ácido láctico al 5% durante 5 minutos. Según los resultados, el ácido láctico se podría usar como descontaminante en carne de pollo refrigerada teniendo en cuenta que no se altera el olor, textura y sabor del producto.

Sí se produce, sin embargo, decoloración en la carne, lo que limita la aceptación general del producto en el análisis sensorial. En conclusión, los expertos consideran que el lavado de los muslos de pollo con soluciones de ácido láctico es un tratamiento efectivo de descontaminación, aunque en determinados casos produce la decoloración de la carne.

Por este motivo, sería necesario utilizar un ácido láctico tamponado, sólo o en combinación con otros tratamientos para la búsqueda de posibles sinergias.

Otros estudios realizados en la industria avícola, en la nutrición de pollos de engorde aseguran que el uso de ácido láctico es una herramienta eficaz para reemplazar a los antibióticos promotores del crecimiento; no es antibiótico, pero si se usa correctamente junto con medidas nutricionales, de manejo y de bioseguridad, es una herramienta poderosa para mantener la salud del tracto gastrointestinal de las aves, mejorando así su rendimiento zootécnico.

### **1.2.8 Modo de Acción**

El principio básico clave del modo de acción de los ácidos orgánicos sobre las bacterias es que los ácidos orgánicos no disociados (no ionizados y más lipofílicos) pueden penetrar a través de la pared celular bacteriana y alterar adversamente la fisiología normal de ciertos tipos de bacterias.

Como describieron Lambert y Stratford, después de penetrar a través de la pared celular de la bacteria, los ácidos orgánicos no disociados quedan expuestos al pH interno de la misma ( $7.85 \pm 0.05$  para *E. coli*;  $n = 40$ , [Roe]) y se disocian liberando  $H^+$  y aniones ( $A^-$ ). El pH interno disminuye y, debido a que las bacterias sensibles al pH no toleran una diferencia muy grande entre el pH interno y el externo, se activa un mecanismo específico (bomba de  $H^+$  -ATPasa) para hacer que el pH dentro de la bacteria retorne a su nivel normal. Este fenómeno consume

energía y, eventualmente, puede detener el crecimiento de la bacteria o incluso matarla.

La reducción del pH interno involucra otros mecanismos como la inhibición de la glucólisis, el impedimento del transporte activo y la interferencia con la transducción de señales.

La parte aniónica (A-) del ácido queda atrapada dentro de la bacteria porque se difunde libremente a través de la pared celular sólo en su forma no disociada. La acumulación de A- se torna tóxica para la bacteria mediante complejos mecanismos que implican un desbalance aniónico conducente a problemas osmóticos internos para el germen.

Por el contrario, las bacterias insensibles al pH toleran un diferencial mayor entre el pH interno y el externo y, si el pH interno alcanza niveles suficientemente bajos, los ácidos orgánicos reaparecerán en su forma no disociada y saldrán de la bacteria por la misma vía que entraron, lo cual crea un equilibrio y la bacteria no sufre problema alguno por esta situación.

Como ocurre con los antibióticos, las bacterias tienen diferentes niveles de sensibilidad a los distintos ácidos orgánicos bajo circunstancias específicas.

Sin embargo, al contrario de lo que ocurre con los antibióticos, parece que los



ácidos orgánicos comparten un mismo modo de acción a pesar de su variedad de estructuras químicas. Todos tienen mayor potencia antimicrobiana a medida que el pH se hace más ácido (Lambert y Stratford) lo cual de hecho es incompatible con la fisiología normal del animal e incluso con la vida.

## **2. MATERIALES Y METODOS**

### **2.1 DESCRIPCION Y DATOS IMPORTANTES DEL LUGAR DE CAPTURA**

#### **2.1.1 Sitio de captura**

Las zonas de pesca están cerca a las comunidades y circundan el área de la Isla Costa Rica, que es una pequeña comunidad de pescadores que se encuentra a 60 minutos en bote fuera de borda desde puerto Hualtaco, aprovechando la marea alta, surcando por el Canal Internacional en cuyas orillas se expone el mangle rojo *Rizophora mangle*; es una isla de 6.000 hectáreas de extensión.

La comunidad de Costa Rica desde el año 2.000 tiene bajo custodia un área de 519,70 hectáreas de concesión para uso y manejo sostenible de recursos hidrobiológicos.

Uno de los proyectos precisamente son “Corrales de cría de conchas negras”, pequeños palenques con mallas en donde se ejecuta una interesante actividad productiva de manejo sostenible de recursos que viene ensayando con mucho éxito la comunidad organizada, como una opción económica rentable en armonía con la naturaleza.



*Figura 7.- Comunidad de Costa Rica y corrales de engorde de concha prieta*

Costa Rica está integrada por 67 familias residentes que se ubican en un excelente sitio cuyas viviendas se encuentran dispuestas de manera lineal en un espacio llano colindante entre el canal de bosque manglar y bosque dulce.

Casi todas las viviendas son de material modesto. Tiene una escuela y cuenta con energía eléctrica limitada, escasa agua dulce y no disponen de servicio telefónico.

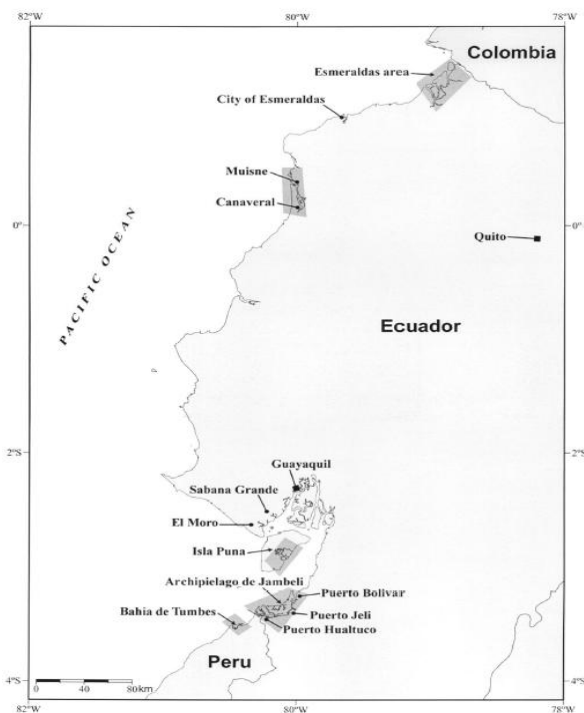


Figura 8.- áreas recolectoras de *A. tuberculosa* en Ecuador

### 2.1.2 Métodos de captura de los organismos

Las faenas para la captura de la concha prieta se efectúan según el comportamiento de las mareas. Cuando la marea comienza a bajar (media marea) los recolectores entran al manglar.

El tiempo real de faena es de 4 a 6 horas. El tiempo estimado está relacionado con los períodos de máximas y mínimas mareas (mareas vivas), las cuales presentan dos máximas y dos mínimas durante el mes, con aproximadamente 7 días de duración. El

período de mareas máximas es óptimo para la recolección, porque las áreas de exploración se mantienen por más tiempo libre de inundación.

Los moluscos se buscan en las cavidades que se encuentran al lado de las raíces del mangle, introduciendo las manos a una profundidad entre 5 y 30 cm. aproximadamente y en todas las direcciones

Cada grupo tiene varias áreas de recolección a las que se accede en una lancha de madera, de remo o con motor fuera de borda. Estos sitios se visitan alternadamente, a intervalos de una semana.

Los ejemplares se trasladan a cada comunidad, y se almacenan en cajones o en pilos en el piso. Se determinó que el tiempo máximo de duración de la concha en estos sitios, sin deteriorarse, es de 8 días.

Esta pesquería carece de planificación. Los recolectores venden el producto en unidades de cientos de conchas a intermediarios.

### **2.1.3 Tamaño de captura**

En Hualtaco el tamaño de venta de las conchas es de 4,0 cm a 4,8 cm. Los comerciantes pagan mejor por la concha “pareja” (de un mismo tamaño).

Cuando se recolectan tallas menores, las conchas se crían en corrales durante cuatro o cinco meses, o hasta que alcanzan los 4 cm, que es el tamaño que ellos usan para su comercialización. Las asociaciones Costa Rica y Nueve de Octubre dentro de la isla tienen ocho corrales.

#### **2.1.4 Datos estadísticos de captura**

Un estudio del Instituto Nacional de Pesca (Mora de Baños Elba, 1999) indica que en el año 1999 se recolectaron algo más de 26 millones de conchas prietas en San Lorenzo y Muisne (Esmeraldas), El Morro, en Guayas, y en los puertos artesanales Jelí, Bolívar y Hualtaco (El Oro). Hace 20 años se recolectaban 34,4 millones, según un estudio del mismo Centro de Investigaciones.

En Costa Rica cada conchero extrae un promedio de 400 conchas prietas durante tres días. El ciento de conchas promedia los \$8 hasta Septiembre del 2011.

#### **2.1.5 Periodos de veda en el país**

La concha prieta se comercializa sin tomar en cuenta su tamaño, lo cual propicia una sobrepesca del recurso. En la comunidad de Costa Rica el tamaño mínimo para su captura y venta es de 4 cm; ellos aducen que aunque este no es el tamaño adecuado

según la ley de vedas, es muy difícil conseguir abundancia de moluscos mayores a los 4.5 cm y toman ese tamaño como base

En la actualidad este recurso se halla vigilado. Las vedas van del 15 de febrero al 30 de marzo.

En Guayaquil, el 24 de octubre del 2001; según acuerdo ministerial del Subsecretario de Recursos Pesqueros, decretó un periodo de veda basado en estos dos artículos principalmente:

*Art. 1.- Establecer en todo el territorio nacional una veda para la captura, transporte, posesión, procesamiento, y comercialización interna y externa de los moluscos bivalvos concha prieta en las especies Anadara tuberculosa y Anadara similis, durante el período comprendido desde las cero horas del 15 de febrero hasta las veinticuatro horas del 31 de marzo de cada año.*

*Art. 2.- Dentro del lapso de un año, contado a partir de la vigencia del presente acuerdo ministerial, se prohíbe la captura y comercialización de concha prieta, de talla menor a 45 mm. (4,5 cm.) de longitud total, a fin de permitir la sustentabilidad del recurso concha y por ende de la actividad pesquera.*

## **2.2 MATERIALES Y MÉTODOS DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS**

### **2.2.1 Enumeración de Coliformes y *E. coli* como indicadores microbiológicos**

El *E. coli* se distribuye extensamente en el intestino de seres humanos y de animales de sangre caliente y es el anaerobio facultativo predominante en el intestino y la parte de la flora intestinal esencial que mantiene la fisiología del anfitrión sano (Neill, M. A., 1994). El *E. coli* es un miembro de la familia de las enterobacterias, que incluye muchos géneros, incluyendo patógenos tales como *salmonellas*, *Shigella*, y de *Yersinia*.

Aunque la mayoría de los síntomas de *E. coli* no se miran como patógeno, pueden ser los patógenos oportunistas que causan infecciones a los anfitriones. Existen también los síntomas patógenos de *E. coli* cuando es ingerido, esta es la causa de una enfermedad gastrointestinal en seres humanos sanos.

En 1892, Shardingger propuso el uso de *E. coli* como indicador de la contaminación fecal. Esto fue basado en la premisa que el *E. coli* es abundante en heces humanas y animales y encontrada no generalmente en otros lugares.

Además, puesto que el *E. coli* se podría detectar fácilmente por su capacidad de fermentar la glucosa (cambiante más adelante a la lactosa), era más fácil aislar que patógenos gastrointestinales oportunistas. Por lo tanto, la presencia de *E. coli* en

alimento o agua se aceptó como indicativo de la contaminación fecal reciente y la presencia posible de patógeno específicos.

Aunque el concepto de usar *E. coli* como indicador indirecto del riesgo de salud era viable, fue complicado en la práctica, debido a la presencia de otras bacterias entéricas como el *Citrobacter*, el *Klebsiella* y otras *enterobacterias* que pueden también fermentar la lactosa y son similares a *E. coli* en características fenotípicas, para no distinguirlos fácilmente. Consecuentemente, el término “coliforme” fue acuñado para describir este grupo de bacterias entéricas.

El Coliforme no es una clasificación taxonómica sino una definición de trabajo usadas para describir un grupo de bacterias barra-formadas anaerobias Gram-negativa, facultativas que fermentan la lactosa para producir el ácido y gas dentro de 48 h en 35°C.

Aunque los coliformes eran fáciles de detectar, su asociación con la contaminación fecal era cuestionable porque algunos coliformes se encuentran naturalmente en las muestras ambientales (4). Esto condujo a la introducción de los coliformes fecales como indicador de la contaminación. El grupo de coliformes fecales consiste sobre todo en *E. coli*. Actualmente, utilizan a los 3 grupos como indicadores pero en diversos usos Council Directive (91/492/EEC):



- La *detección de coliformes totales* se utiliza como indicador de la calidad sanitaria del agua o como indicador general de la condición sanitaria en el ambiente de la transformación alimenticia.
- Los *coliformes fecales* siguen siendo el indicador estándar de la opción para la calidad del agua y cosecha de los crustáceos
- *E. coli* se utiliza para indicar la contaminación fecal reciente o el proceso antihigiénico.

Según los Principios de Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos para garantizar la inocuidad de los alimentos (Art. 3 APPCC), y el Manual de Buenas Prácticas para Cultivo de Moluscos Bivalvos; los límites microbiológicos permitidos son:

- Límites microbiológico de Coliformes totales y fecales en agua de Mar :

0 UFC / 100 ml.

- Límites microbiológicos para moluscos depurados:

Coliformes fecales < 300 UFC / 100gr.

*E. coli* < 230 UFC / 100gr.

### 2.2.2 Método para el Recuento de *E. coli* / Coliformes

Para las pruebas microbiológicas se usaron las placas Petrifilm 3M para el recuento de *E. coli*/Coliformes, esto se debió a las condiciones del sitio, las cuales impidieron el uso de los métodos de análisis convencional.

Las Placas Petrifilm 3M están respaldadas por **AOAC método oficial 991.14**. Este método está respaldado por la AOAC Internacional.

Las Placas Petrifilm para el recuento de *E. coli*/Coliformes (Placa Petrifilm EC) contienen nutrientes de Bilis Rojo Violeta (VRB), un agente gelificante soluble en agua fría, un indicador de actividad de la glucuronidasa y un indicador que facilita la enumeración de las colonias.

La mayoría de *E. coli* (cerca del 97%) produce beta-glucoronidasa, la que a su vez produce una precipitación azul asociada con la colonia. La película superior atrapa el gas producido por *E. coli* y coliformes fermentadores de lactosa. Cerca del 95% de las *E. coli* producen gas, representado por colonias entre azules y rojo azules asociadas con el gas atrapado en la Placa Petrifilm EC (dentro del diámetro aproximado de una colonia).

Como medio de cultivo para las placas se utilizó un diluyente estéril: el tampón Butterfield (tampón IDF fosfato, 0.0425g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y con un pH ajustado a 7.2),

esta solución es de fácil manejo. Las placas y la solución fueron refrigeradas para mantener sus características.

Para mantener la T°C 35° +/- 1° C necesaria para la incubación de las bacterias, se acondicionó una caja con tapa de espumaflex que contenía un termómetro y un foco, pero por la escasa disposición de luz eléctrica se mantenía la temperatura depositando cada 2 horas agua caliente dentro de la caja, para así poder regular y controlarla los momentos que no había luz.

## **2.3 DISEÑO**

### **2.3.1 Diseño del sistema de depuración**

Este sistema de depuración está compuesto por 2 tanques de 250 litros cada uno, 1 tanque de 500 lt y 1 tanque de 1000 lt, donde se almacenó el agua previamente bombeada y filtrada.

Para este sistema se usarán 6 gavetas con 10 conchas cada una, las medidas de las gavetas son:

Ancho = 24 cm

Largo = 46 cm

Alto = 15 cm (nivel de agua a usarse)

Volumen de agua necesario = 16.56 lt.

Para el llenado inicial de cada gaveta se usaran 16.56 lt. , por lo que en total para las 6 gavetas se necesitara un volumen de agua prefiltrada y adicionada con ácido de 100 litros.

Para hallar el caudal necesario que se usara en las diferentes horas de prueba 8, 12, 24, 48 h., se debe tomar en cuenta que la tasa de filtración promedio de la *Anadara tuberculosa* es de 2.08 lt./h en condiciones normales.

Tasa de filtración / concha	=	2.08 lt/h
Volumen a filtrarse en 8 h	=	16.64 lt/concha (2.08lt/h x 8h)
Volumen total 60 conchas	=	1000 lt.
Caudal a usarse	=	1000 lt / 8h = 125 lt/h
	=	<b>0.35 lt/10seg.</b>

El mismo cálculo se realiza para las diferentes horas del ensayo por lo cual el resultado es constante y se determina que el caudal necesario para la distribución del agua en el sistema es de 0.35lt/10seg. Lo cual se reguló con una llave de agua manual.

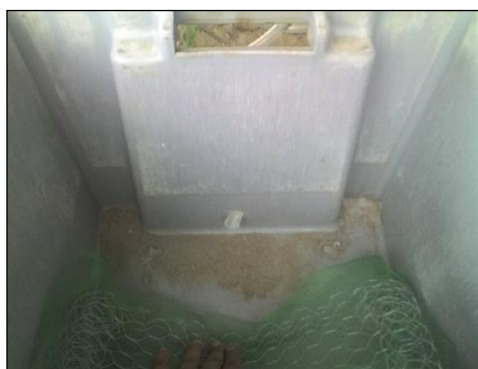
### 2.3.2 Instalación del sistema

La comunidad Costa Rica no cuenta con las facilidades de luz todo el día ni agua potable, así como tampoco dispone de medios para su fácil acceso todo el tiempo;

razón por la cual se instaló un campamento provisional para realizar todas las pruebas y ensayos.

El campamento se ubicó en una punta de la isla donde encontramos agua todo el tiempo por estar abierto al mar, así como tampoco existe tránsito de embarcaciones por ese sector, lo cual ayudó al manejo del sistema y a evitar contaminación por combustible.

Los tanques y gavetas fueron previamente lavados con cloro y secados al sol por un día. Se elaboraron mallas para usarse en el fondo de las gavetas con el fin de crear un nivel de separación de aprox. 4 cm entre las conchas y los sedimentos depositados en el fondo durante el proceso de depuración.



*Figura 9.- Imágenes de la Instalación del Sistema de Depuración en la Isla Costa Rica*

### 2.3.3 Sistema de toma y distribución del agua

La toma de agua se instaló en un sector donde encontramos agua limpia y fresca necesaria para el sistema de depuración, se usó una bomba de 1 Hp, se extendió una línea de 8m de tubería de pvc de 0.5” desde la orilla hasta alcanzar una profundidad de 4m donde la extracción del agua de buena calidad fue factible.

La toma de agua fue ubicada en la punta de la isla, donde se encontraba instalado el campamento; en un sector que posee buena calidad de agua por encontrarse abierto al mar, lejos de las embarcaciones pesqueras de la isla y alejada de cualquier contaminación subterránea producto de las aguas servidas de la comunidad. Otra razón por la cual se seleccionó este sitio para la toma de agua, es por encontrarse cercano a un punto de toma eléctrica para el funcionamiento de la bomba.

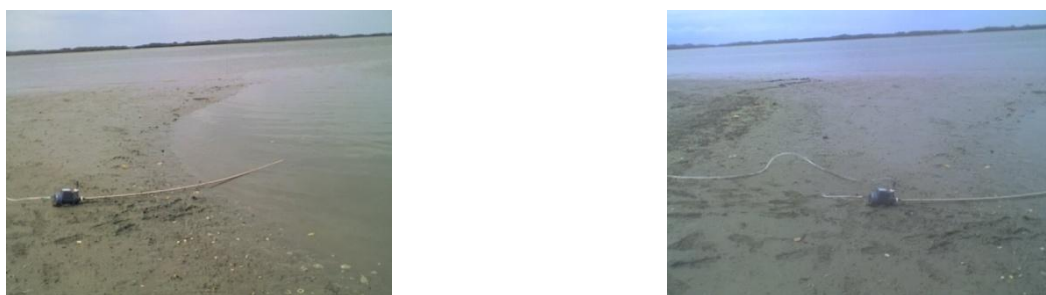


Figura 10.- Toma de agua para el sistema (bomba de agua de mar 1 Hp)

Las horas de bombeo se realizaban de acuerdo a la disponibilidad de la luz eléctrica, a las 12h00 y/o a las 18h00, dependiendo de la cantidad de agua necesaria para los ensayos; el tiempo estimado de bombeo era de 45 – 55 min.

Para llenar los 3 tanques con un volumen total de 1000 lt. (1 tanque de 1000 lt, 1 tanque de 500 lt y 2 tanques de 250 lt c/u).

El agua luego de ser extraída por las tuberías de pvc, era conducida por 20 m de mangueras de plástico transparente hasta los tanques reservorios para ser filtrados, tratados y almacenados de acuerdo al protocolo de desinfección del agua.



Figura 11.- Distribución del agua bombeada en el sistema

#### 2.3.4 Filtro de sólidos

Para la retención de partículas y sedimentos que se encuentran formando los sólidos suspendidos del agua, se usaron filtros de bolsa de monofilamento de nylon de 50u con dimensiones de 81.3 cm. x 17.8 cm. que fueron colocados en las mangueras que conducen el agua a cada tanque para su filtración antes de la descarga del agua bombeada.

Estos filtros son lavables y reusables, luego de cada filtración se los procedía a lavar con cloro al 80% y secarlos al sol hasta su siguiente uso.

### **2.3.5 Sistema de desinfección del agua con Ácido Láctico**

Para determinar la concentración de ácido láctico necesaria para la desinfección del agua, se procedió a realizar ensayos previos con muestras de agua tomadas del estero de Pto. Hondo (Guayas) con la finalidad de conseguir una estimación de la concentración y el tiempo en el cual el ácido purifica y desinfecta el agua que será usada en el sistema de depuración para la concha prieta de la isla Costa Rica.

## **2.4 OPERACIÓN DEL SISTEMA**

### **2.4.1 Preparación de los Tanques**

Los tanques previamente lavados con cloro al 80% y secados al sol un día antes, fueron llenados con el agua bombeada y previamente filtrada (filtro de monofilamento).

### **2.4.2 Muestreo inicial microbiológico**

#### **2.4.2.1 Protocolo de Ensayo Microbiológico Utilizado en Laboratorio**

##### **FIMCBOR**

##### **Agar MacConkey:**

Es el medio primario selectivo y diferencial que se emplea más a menudo; contiene violeta cristal para inhibir el crecimiento de cocos grampositivos y rojo neutro como



indicador de pH, que le otorga propiedades diferenciales. Los bacilos gramnegativos se desarrollan fácilmente; los fermentadores de lactosa producen metabolismo ácidos que disminuyen el pH del medio próximo a la colonia. En esa zona el rojo neutro vira al rojo. Los no fermentadores de lactosa permanecen incoloros y translúcidos.

- Sacar los cálculos para hacer el Agar MacConkey, Cloruro de Sodio, Agua de Pectona.
- Pesar en la balanza los gramos necesarios para cada mezcla.
- Calentar el agar luego de mezclado con el cloruro de sodio en microondas o estufa, luego colocar en el autoclave al igual que el agua pectona para esterilizar puesta ya en tubos de ensayo y el sobrante de la solución se lo coloca en un matraz de 100 ml. para posteriores usos.
- Tapar los tubos de ensayo con papel aluminio para mayor seguridad (evitar crecimiento bacteriano)
- Las soluciones son preparadas con agua destilada.
- El autoclave debe llegar a 121C aprox. 1 hora (de 15 a 20 minutos a 121C, 1 hora es lo que tarda hasta llegar a esa temperatura).

### **Cálculos**

Se usarán 150 cajas (3 cajas petri para cada concentración por hora/5 horas) y 20 cajas Petri para bioensayo en concha.

➤ Una caja Petri > 15 ml/caja = 15 \* 170 = 2550 ml total de medio

➤ Agar Mc Conkey > 50gr/1000ml Agua destilada

50gr----- 1000ml

X----- 2600ml

R//----- 130 gr. Agar / 2600ml de  
medio (agua destilada)

➤ NaCl > 0.5gr/cada 100ml

0.5gr NaCl ----- 100 ml

X----- 2600 ml

R//----- 13gr NaCl/2600 ml

➤ Se mezclan los siguientes compuestos:

130 gr. Agar + 2600 ml de agua destilada + 13 gr. NaCl

➤ Luego para hacer las diluciones se necesita agua de Pectona 1600ml (170

tubos\* 9ml c/tubo = 1530ml)

25.5 gr.----- 1000 ml

X----- 1600 ml

R//-----40.8 gr.

#### **2.4.2.2 Ensayo inicial con concentraciones de Ácido láctico en agua de Pto. Hondo**

##### **(Guayas)**

##### **Preparación de la muestra de agua**

➤ Traer agua de estuario con características similares a las de Costa Rica (2 gls).

- Filtrar agua con filtro de bolsa.
- Medir 100 ml de agua con ácido láctico y colocar esa cantidad en frascos de vidrio.

### **Adición del ácido láctico**

Colocar ácido láctico en 3 botellas de 1000 ml para alcanzar concentraciones de 10, 20 y 25 ppm respectivamente y añadir un frasco más solamente con agua para que sea usado como control.

### **Procedimiento**

- Tomar muestras cada hora
- Sembrar por duplicado muestras de agua con las diferentes concentraciones en Agar MacConkey previamente preparado.
- Sembrar por separado muestras de agua de control (M)
- Sembrar para cada concentración y para el agua de control 3 tubos de ensayo con las diluciones de  $10^0$ ,  $10^{-1}$  y  $10^{-2}$  para seguir los pasos descritos para cultivos microbiológicos.

### **Cálculos para las Concentraciones: 10, 20, 25, 30, 40 ppm**

Debido a que el ácido láctico es líquido procedemos a transformar las cantidades de masa a volumen utilizando la densidad del ácido láctico.

Densidad = 1.21 g / lt

➤ **10 ppm** ----- mg/lit

$$V = 0.010 \text{ g} / 1.21 \text{ g/ml} = 8.26 \times 10^{-3} \text{ ml/lit} \quad \text{R// ----- } 0.00826 \text{ ml/lit}$$

(8.26  $\mu\text{l}$ )

Se sigue el mismo cálculo para todas las concentraciones, reemplazando los valores respectivos, entonces queda así:

➤ **10 ppm** = 0.00826 ml ----- 8.26  $\mu\text{l}$

➤ **20 ppm** = 0.0165 ml ----- 16.52  $\mu\text{l}$

➤ **25 ppm** = 0.0206 ml ----- 20.66  $\mu\text{l}$

➤ **30 ppm** = 0.0247 ml ----- 24.79  $\mu\text{l}$

➤ **40 ppm** = 0.0330 ml ----- 33.05  $\mu\text{l}$

### Parámetros

Se midió el pH de las botellas con Acido láctico:

Agua normal = 7.2

10 ppm = 6.2

20 ppm = 5.7

25 ppm = 5.4

30 ppm = 5.0

40 ppm = 4.5

### **2.4.2.3 Bioensayo en *Anadara tuberculosa* de Puerto Hondo (Guayas).**

Luego de hallada la concentración de ácido láctico necesaria para la desinfección del agua la cual es de: 40 ppm con un pH de 4.5 y con un tiempo de duración de 8 horas, se procede a encontrar el tiempo de inmersión de las conchas en el agua desinfectada.

Para este ensayo inicial se utilizaron 300 conchas, las cuales fueron colocadas en 4 recipientes:

- Recipiente A: 75 conchas
- Réplica A : 75 conchas
- Control: 75 conchas
- Réplica: 75 conchas

En cada recipiente se colocan las conchas respectivas y el agua desinfectada previamente con el ácido láctico, en este ensayo no se prueba aún el sistema de depuración completo con entrada y salida del agua en las bandejas, solo se mantienen las conchas en los recipientes con el agua estática para probar el tiempo en el cual el agua desinfectada logra ejercer su acción depuradora en el tracto digestivo del molusco.

Se recogieron muestras de carne cada 8 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas y 48 horas de conchas sometidas al tratamiento así como las de control. Cada uno de los recipientes contenían 75 conchas, puesto que para cada análisis se usaban 15 conchas (60 gr. de carne) con sus respectivas réplicas correspondientes a cada hora.

Con las muestras de carne de cada tiempo se procedió a realizar análisis microbiológicos para determinar si existía disminución bacteriana luego de estas horas.

### **2.4.3 Tiempo de Inmersiones:**

#### **2.4.3.1 Determinación de la concentración y tiempo de Ácido Láctico en el agua de Costa Rica (El Oro)**

Luego de estas pruebas preliminares se realizaron las pruebas in situ, en la Isla Costa Rica (El Oro), para desarrollar el sistema de depuración en esta Comunidad.

El agua bombeada fue filtrada antes de almacenarla en los tanques, luego se probó la adición del ácido en las cantidades y tiempo previamente establecidos por los análisis realizados en facultad. Se probó con 2 concentraciones 35, 40 ppm.

Con la finalidad de conocer el grado de contaminación previo a la adición del ácido, se realizaron los muestreos iniciales microbiológicos del agua que fue bombeada en

la punta de la isla para el desarrollo del sistema. Cabe destacar que para estos ensayos se sustituyó la solución de agua peptona por una solución tampón Butterfield (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) a 0.0425g/lit

A esta agua se le realizaron los análisis para determinar la cantidad de coliformes totales y fecales presentes en ella; esto se lo hace con la finalidad de conocer la calidad de agua a usarse para los ensayos, gracias a que estas enterobacterias sirven como indicadores microbiológicos.

#### **2.4.3.2 Determinación del tiempo de inmersión de Concha Prieta en agua con Ácido Láctico**

Una vez determinada la concentración y tiempo del ácido necesarios para la desinfección del agua; se realizaron los análisis microbiológicos iniciales de la concha prieta en los 3 sectores de recolección pertenecientes a las zonas de concesión.

- Sector A : Diluvio (cercano a camaroneras)
- Sector B : Los Chanchos
- Sector C : La Islita (sector ubicado frente a la comunidad)

Los ensayos en *Anadara tuberculosa* se realizaron en 3 etapas. Cada etapa, dependiendo del sector recolectado por día; siendo así el primer ensayo fue realizado con las conchas recolectadas del sector A o diluvio.

Para determinar la carga bacteriana en los diferentes tiempos de prueba, se usaron 10 conchas para cada análisis. Estas conchas fueron elegidas aleatoriamente entre las 6 gavetas sometidas a depuración.

Con esto se pretende establecer una comparación entre la contaminación del molusco antes y después de la depuración, para determinar la eficacia del sistema.

Estos análisis fueron realizados bajo el método de las placas petrifilm para la determinación de *E. Coli*, coliformes fecales; los resultados fueron conocidos luego de las 48 horas de incubación.

#### **2.4.4 Manejo de los moluscos en el sistema**

Se llenaron las bandejas con la cantidad de agua con ácido láctico calculada, posteriormente se colocaron las 10 conchas por cada gaveta para iniciar la distribución del agua en el sistema.



Con esto se desea obtener el tiempo estimado en que las conchas deben permanecer en el sistema para depurar su organismo de los agentes patógenos *E. Coli* y coliformes fecales.

Las conchas usadas para los ensayos fueron compradas a los recolectores de la comunidad, pertenecían únicamente a las 3 zonas de concesión; esto se hizo con la finalidad de establecer las diferencias de carga bacteriana correspondiente a cada sector, así como también para involucrar a los recolectores en el proceso.

El tamaño de las conchas usadas en todos los ensayos era superior a los 4.5 cm.

Las conchas se depositaron en las bandejas con agua hasta los 15 cm, se dejó fluir el agua desde el tanque reservorio hasta las bandejas por las líneas de distribución (mangueras), con el caudal calculado de acuerdo a la tasa de filtración conocida de la *Anadara tuberculosa*.

La depuración se la desarrollo en 2 días, con el fin de completar las 48 horas de prueba del sistema. Este tiempo era usado para cada sector, siendo así que el tiempo de pruebas total fue de 6 días para cubrir los 3 sectores de recolección.

#### **2.4.5 Control de parámetros: Salinidad, Temperatura, pH, concentraciones microbiológicas**

Durante todos los ensayos se llevo un control de los parámetros usando un Salinómetro y un termómetro, para cubrir la salinidad, temperatura y pH.

Los controles se realizaban al mismo tiempo que se recogían las muestras para los análisis microbiológicos.

#### **2.4.6 Drenado de los recipientes y cosecha de los moluscos**

El agua que ingresa a las gavetas por un orificio en uno de sus lados, lo hace por medio de las mangueras que distribuyen el agua, con un flujo de 0.35 lt/10seg.; al mismo tiempo por el otro extremo de la gaveta existe un par de ranuras a la altura de los 16 cm, las cuales sirven para que el agua sea eliminada por rebose.

Con este flujo continuo se busca que el agua ingrese a la gaveta desde el fondo y se distribuya de manera homogénea; por toda el área hasta llegar al otro extremo y encontrar la salida en la superficie por medio de las ranuras.

Después de terminar el proceso de depuración los moluscos fueron extraídos manualmente de cada gaveta y depositados en un recipiente limpio para comenzar

la fase de degustación que demostrará si sus características organolépticas han variado.

El drenado del agua usada fue constante, por lo que se instaló el sistema en un sitio a las orillas de un canal de entrada a la isla, donde se dejaba fluir el agua usada y por este medio regresaba al mar. Este canal estaba alejado de la toma de agua para evitar una recontaminación.

#### **2.4.7 Limpieza de las bandejas depuradoras**

Los sedimentos y excretas eliminadas por los moluscos, quedan asentados en el fondo y son eliminados al final del proceso de depuración. Una vez que el agua ha sido drenada, se enjuaga las gavetas con agua limpia bombeada y filtrada; se las vacía para eliminar las excretas, luego se vuelve a agregar agua y se coloca una cantidad de cloro al 80% para desinfectarlas.

Las gavetas, mangueras, tanques y otros materiales usados en el sistema de depuración son lavados con cepillo y cloro, y se los deja así por 24 horas; al día siguiente se los expone al sol para su secado y poder volverlos a usar.

#### **2.4.8 Muestreo microbiológico y análisis comparativos**

Los muestreos microbiológicos se realizaban cada 8, 12, 18, 24, 48 horas después de iniciado el proceso de depuración. Las conchas eran extraídas de las mismas gavetas cada cierto tiempo, puesto que el proceso no culminaba hasta completar las 48 horas.

Se cogían 10 conchas en total de las 6 gavetas que estaban siendo sometidas a la depuración. Estas conchas eran abiertas y se extraía su carne y líquido, posteriormente eran licuados. Todo este procedimiento se realizaba bajo medidas de asepsia y en la presencia de 2 mecheros para evitar la contaminación.

Entre el líquido y la carne de las 10 conchas prietas, el peso aproximado era de 50 gr. en conchas > 4 cm; de esta masa se usaban 20 gr. para las placas de cultivo y 20 gr. para su réplica. Esto era sembrado en las placas petrifilm y colocado dentro de una caja que mantenía el calor como una incubadora, puesto que para el cultivo de las bacterias se necesitaba una temperatura de mínimo 34°.

Por cada muestreo se sembraban 2 placas: para recuento de *E. coli* y coliformes totales, y otra placa para el recuento de coliformes fecales.

La incubación de las placas de coliformes fecales así como las de coliformes totales tomaba 24 horas a 34°, mientras que las de *E. coli* necesitaban 48 horas a la misma temperatura para determinar sus resultados.

#### **2.4.9 Estadísticas de las pruebas**

Los resultados de las placas eran analizados y comparados entre sí; así como también con los resultados iniciales microbiológicos para determinar la eficacia del ácido y el tiempo y condiciones necesarias para que se cumpla la depuración.

En los ensayos en agua de acuerdo a los resultados obtenidos en cada análisis se ajustaban las concentraciones de ácido láctico, hasta llegar a la concentración que nos permitía eliminar los agentes patógenos presentes en la misma.

En los primeros ensayos con agua de estero en Pto. Hondo (Guayas), los análisis microbiológicos eran generales, se usaba agar MkConkey para determinar simplemente si existía ausencia o presencia de bacterias.

Luego de hallada la concentración y tiempo buscados, se realizaron los ensayos definitivos en la Comunidad de Costa Rica para concluir si existían similitudes o diferencias, lo cual produciría una variable en las concentraciones.

Para este ensayo con el agua de Costa Rica se hicieron análisis más detallados de coliformes fecales y totales. De la misma manera se procedió con las muestras de la concha prieta a las cuales se les realizaron las pruebas de coliformes fecales y *E. coli*.

Luego de conocer los resultados en cada muestreo se realizaban las correcciones pertinentes para buscar el funcionamiento más adecuado del sistema en esa Comunidad.

#### **2.4.10 Análisis Sensorial post - depuración**

Por último se realizó un análisis sensorial para determinar si existía diferencia significativa en los atributos sensoriales de las conchas depuradas con respecto a las conchas sin depurar.

Para esto se prepararon 2 kilogramos de ceviche compuesto por el jugo y la carne de conchas sin depurar, jugo de limón, cebolla, culantro picados y sal.

Utilizando la misma proporción de ingredientes, y bajo las mismas condiciones, se procedió a preparar otro ceviche utilizando conchas depuradas con el método que fue definido previamente.

Se realizó una prueba triangular de diferencia, con 10 habitantes consumidores habituales de concha prieta, y de acuerdo con el método descrito por Pangborn y Pedrero (1989), en el que se le presenta al panelista un trío de muestras en el que dos de ellas son iguales y la otra es diferente, y el panelista debe indicar cuál es la diferente.

Tomando las repeticiones como observaciones individuales (para un total de 20 observaciones), se procedió a tabular el número de aciertos y desaciertos.

### **3. ANALISIS DE FACTIBILIDAD EN EL MERCADO**

#### **3.1 Análisis Oferta-Demanda**

La venta se la realiza a compradores intermediarios que se encuentran en Puerto Hualtaco. Estos a su vez lo distribuyen a los puntos de comercialización del molusco como hoteles, restaurantes, mercados y supermercados.

La Asociación de concheros Costa Rica tiene 6 compradores fijos para cada semana, pero eso varía dependiendo de la época, puesto que existen fechas donde estos aumentan hasta 12. En la Asociación existen 37 recolectores de concha inscritos.

El promedio de recolección por persona es de 400 conchas en 3 días de trabajo.

#### **3.2 Definición del Mercado Meta**

La demanda de la concha prieta es buena, especialmente en el sector de Pto. Hualtaco. Existen compradores que están dispuestos a pagar una mayor cantidad de dinero por un producto que garantice su calidad, puesto que sus principales consumidores así lo exigen.

De acuerdo a las entrevistas realizadas en el puerto a los compradores, la necesidad de vender una concha más limpia y con mayor seguridad de consumo es grande, esto se da debido a que una gran cantidad de esta concha se distribuye a los hoteles y supermercados de las ciudades aledañas al sector, no solo de la provincia de El Oro; sino también para el lado del Perú.

También se debe tomar en cuenta la necesidad de los recolectores de aumentar sus ingresos y mejorar su calidad de vida; si es tomado en cuenta el hecho que sea su único medio de subsistencia.

### **3.3 Análisis de Precios, Canales de Comercialización y Competencia**

El sistema de venta de la concha prieta *Anadara tuberculosa*, se realiza dependiendo de la cantidad recolectada. En el puerto de venta de los recolectores llamado Puerto Hualtaco, el precio es de \$8 las 100 conchas surtidas, esto es cuando son de diferentes tamaños tomando en cuenta que el tamaño mínimo de venta que ellos usan es de 4 cm; siendo así, que si existe una mayor cantidad de grandes (> 4.5 cm) que de pequeñas el precio asciende hasta \$9 máximo.

Por otro lado el precio de la concha pareja, denominada así porque todas son de un tamaño promedio (> 4.5 cm), es de \$10 máximo. Esta situación se da muy poco debido a la sobreexplotación que ha venido sufriendo este recurso durante mucho



tiempo, razón por la cual cada vez es más complicado encontrar gran cantidad de animales de este tamaño.

Los recolectores de concha de la Isla Costa Rica que pertenecen a la Asociación Costa Rica, no se dedican a ninguna otra actividad más que a la recolección del molusco, por lo que es necesario darle un valor agregado a su producto para que su esfuerzo se vea reflejado en un aumento en sus ingresos.

La venta de las 400 conchas por esfuerzo de captura nos dan un total de 14800 conchas a la semana, que recolecta la asociación y las cuales sí se las vende por pedido en un solo volumen pueden hacer que los intermediarios paguen hasta \$9 - \$9.50 por el ciento de conchas sin depurar.

Según las encuestas realizadas, por una concha limpia de microorganismos y certificada por su calidad, el precio de compra aumentaría hasta los \$13 el ciento por animales mayores a 4.5 cm ya que en los actuales momentos estos tamaños cada vez son más escasos y los compradores pagan bien por ellos.

Este tamaño se debe cumplir puesto que el sistema de depuración es para animales aptos para el consumo humano, y que su captura está permitida por la ley de vedas; que establece este tamaño como mínimo para su captura, comercialización y consumo.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Ensayo inicial con concentraciones de ácido láctico en agua de Pto. Hondo (Guayas).

Luego del análisis microbiológico del agua que fue recogida en Pto. Hondo en la provincia del Guayas; los resultados establecen que las concentraciones de 10 ppm, 20 ppm y 25 ppm de ácido, no reducen la carga bacteriana del agua que originalmente era de 108000 UFC a los límites permitidos.

Agua directa =  $10.8 \times 10^4$  UFC

Réplica =  $10.9 \times 10^4$  UFC

HORAS/ CONCENTRACION	X 10 ppm			Y 20 ppm			Z 25 ppm		
	10°	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10°	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10°	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>
<b>A</b> 0 horas	66	A	A	55	A	A	54	A	A
<b>Réplica A</b>	51	2	A	57	A	A	46	1	A
<b>B</b> 1 horas	60	A	A	47	1	A	50	A	A
<b>Réplica B</b>	60	A	A	45	A	A	43	A	A
<b>C</b> 2 horas	47	A	A	39	A	A	38	A	A
<b>Réplica B</b>	40	A	A	40	A	A	39	A	A
<b>D</b> 4 horas	30	A	A	24	A	A	21	A	A
<b>Réplica D</b>	32	A	A	21	A	A	19	A	A
<b>E</b> 8 horas	21	A	A	16	A	A	8	A	A
<b>Réplica E</b>	18	A	A	19	A	A	11	A	A
<b>A = ausencia de bacterias</b>									

TABLA II. Pruebas de Acido láctico a 10, 20,25 ppm en agua de Pto. Hondo (Guayas).

De acuerdo a estos resultados a medida que se aumenta la concentración de ácido láctico, disminuye la cantidad de bacterias en el agua. Para probar disminuir más el número de UFC se procedió a preparar muestras de agua con concentraciones de 30 y 40 ppm siguiendo el procedimiento descrito anteriormente.

Agua directa =  $12.2 \times 10^4$  UFC

Réplica =  $12.8 \times 10^4$  UFC

<b>HORAS/ CONCENTRACION</b>	<b>X 30 ppm</b>		
	<b>10°</b>	<b>10-<sub>1</sub></b>	<b>10-<sub>2</sub></b>
<b>A 0 hora</b>	71	A	A
<b>Réplica</b>	80	A	A
<b>B 1 horas</b>	56	A	A
<b>Réplica</b>	48	A	A
<b>C 2 horas</b>	40	A	A
<b>Réplica</b>	42	A	A
<b>D 4 horas</b>	28	A	A
<b>Réplica</b>	20	A	A
<b>E 8 horas</b>	12	A	A
<b>Réplica</b>	8	A	A
<b>A = ausencia de bacterias</b>			

*TABLA III. Pruebas de Acido láctico a 30 ppm en Guayas*

Agua directa =  $10.4 \times 10^4$  UFC

Réplica =  $10.8 \times 10^4$  UFC

HORAS/ CONCENTRACION	X 40 ppm		
	10°	10- 1	10- 2
<b>A</b> <b>0 hora</b>	61	A	A
<b>Replica</b>	50	A	A
<b>B</b> <b>1 horas</b>	43	A	A
<b>Replica</b>	43	A	A
<b>C</b> <b>2 horas</b>	17	A	A
<b>Replica</b>	18	A	A
<b>D</b> <b>4 horas</b>	6	A	A
<b>Replica</b>	6	A	A
<b>E</b> <b>8 horas</b>	2	A	A
<b>Replica</b>	1	A	A
<b>A = ausencia de bacterias</b>			

*TABLA IV. Pruebas de Ácido láctico a 40 ppm en Guayas*

De acuerdo con estos resultados la concentración adecuada de ácido láctico para la eliminación bacteriana del agua es de 40 ppm, con un valor de pH 4.5 y un tiempo estimado de reposo de 8 horas para completar su acción. Los parámetros de Temperatura y salinidad durante estas pruebas se mantuvieron en los rangos

normales; sin embargo el pH si obtuvo variaciones a medida que se aumentaba la concentración del ácido láctico al agua.

#### 4.2 Bioensayo inicial en *Anadara tuberculosa* de Pto. Hondo (Guayas).

Usando el agua desinfectada de acuerdo a los resultados anteriores (40 ppm), se procedió a someter las conchas a un bioensayo para determinar el tiempo de inmersión que necesita para que el agua desinfectada circule por su organismo realizando un efecto de arrastre de los microorganismos en él presentes.

Muestra directa sin depurar:  $15.8 \times 10^4$  UFC

Replica:  $16.5 \times 10^4$  UFC

pH del agua (8 – 24 horas): 4.4 - 4.7

pH del agua (48 horas): 5.1

Horas / Muestras	8 horas	12 horas	18 horas	<b>24 horas</b>	48 horas
Recipiente A	82	36	21	<b>4</b>	2
Recipiente Replica	87	38	20	<b>1</b>	3
Recipiente Control	142	103	78	<b>38</b>	29
Recipiente Replica Control	134	98	78	<b>34</b>	28

TABLA V. Pruebas en *Anadara tuberculosa* de Pto. Hondo

Las diferencias entre las conchas sometidas a la acción del agua con ácido láctico y las de control son notorias; dándonos como conclusión que el agua desinfectada con ácido es más eficaz para la depuración de las bacterias, que el agua sin ningún elemento que ayude y agilite este proceso.

Los resultados de este ensayo nos indican que el tiempo adecuado para la eliminación bacteriana de la concha prieta es de 24 horas, debido a que en horas posteriores se observa un aumento significativo del pH, lo cual según bibliografías consultadas no es favorable para la eliminación de enterobacterias principalmente.

Siendo así, el pH más recomendado entre 4.5 – 5.0, lo cual se produce en las primeras 24 horas del proceso y nos ayuda a conseguir la muerte del microorganismo.

Además de esto, pasadas las 24 horas el índice de reducción de bacterias disminuye, lo cual indica que el ácido reduce su efectividad sobre las mismas.

#### **4.3 Determinación de concentración y tiempo de Ácido láctico en el Agua de Costa Rica (El Oro).**

Este recuento de coliformes totales solo se hace para el agua, puesto que la detección de Coliformes totales se utiliza como un indicador de la calidad

sanitaria del agua de la transformación alimenticia. Según esto, los límites microbiológicos del agua de mar para un sistema de depuración de moluscos es de 0 UFC/100ml de coliformes totales y fecales.

➤ **Resultados recuento de Coliformes Totales**

Agua directa =  $13.0 \times 10^4$  UFC

Réplica =  $12.6 \times 10^4$  UFC

<b>HORAS/ CONCENTRACION</b>	<b>X 35 ppm</b>		
	<b>10°</b>	<b>10- 1</b>	<b>10- 2</b>
<b>A 0 hora</b>	61	A	A
<b>Réplica</b>	58	A	A
<b>B 2 horas</b>	40	A	A
<b>Réplica</b>	43	A	A
<b>C 4 horas</b>	25	A	A
<b>Réplica</b>	28	A	A
<b>D 8 horas</b>	12	A	A
<b>Réplica</b>	18	A	A
<b>A = ausencia de bacterias</b>			

*TABLA VI. Resultados recuento de Coliformes Totales a 35 ppm*

Agua directa =  $11.4 \times 10^4$  UFC

Réplica =  $12.7 \times 10^4$  UFC

<b>HORAS/ CONCENTRACION</b>	<b>X 40 ppm</b>		
	<b>10°</b>	<b>10-<sub>1</sub></b>	<b>10-<sub>2</sub></b>
<b>A 0 hora</b>	60	A	A
<b>Réplica</b>	65	A	A
<b>B 2 horas</b>	31	A	A
<b>Réplica</b>	38	A	A
<b>C 4 horas</b>	26	A	A
<b>Réplica</b>	10	A	A
<b>D 8 horas</b>	2	A	A
<b>Réplica</b>	1	A	A
<b>A = ausencia de bacterias</b>			

*TABLA VII. Resultados recuento de Coliformes Totales a 40 ppm*

Los resultados de las placas petrifilm para el recuento de coliformes totales dieron como resultado que una concentración de 35 ppm no elimina totalmente los coliformes en el máximo recomendado de 8 horas. Sin embargo se observa una eliminación significativa de las bacterias.



➤ **Resultados recuento de Coliformes Fecales**

Agua Directa =  $8.1 \times 10^4$  UFC

Réplica =  $8.6 \times 10^4$  UFC

<b>HORAS/ CONCENTRACION</b>	<b>X 35 ppm</b>		
	<b>10°</b>	<b>10-<sub>1</sub></b>	<b>10-<sub>2</sub></b>
<b>A 0 hora</b>	65	A	A
<b>Réplica</b>	65	A	A
<b>B 2 horas</b>	32	A	A
<b>Réplica</b>	43	A	A
<b>C 4 horas</b>	16	A	A
<b>Réplica</b>	10	A	A
<b>D 8 horas</b>	0	A	A
<b>Réplica</b>	4	A	A
<b>A = ausencia de bacterias</b>			

*TABLA VIII. Resultados recuento de Coliformes Fecales 35 ppm*

Agua Directa =  $9.4 \times 10^4$  UFC

Réplica =  $9.0 \times 10^4$  UFC

<b>HORAS/ CONCENTRACION</b>	<b>X 40 ppm</b>		
	<b>10°</b>	<b>10-<sub>1</sub></b>	<b>10-<sub>2</sub></b>
<b>A 0 hora</b>	63	A	A
<b>Réplica</b>	65	A	A
<b>B 2 horas</b>	33	A	A
<b>Réplica</b>	31	A	A
<b>C 4 horas</b>	12	A	A
<b>Réplica</b>	9	A	A
<b>D 8 horas</b>	0	A	A
<b>Réplica</b>	0	A	A
<b>A = ausencia de bacterias</b>			

*TABLA IX. Resultados recuento de Coliformes Fecales 40 ppm*

De acuerdo a los resultados de los cuadros anteriores, una concentración de 40 ppm después de 8 horas de tratamiento; coincide en producir la eliminación de coliformes totales y fecales presentes en la misma.

En el muestreo después de 8 horas a 40 ppm para el recuento de coliformes totales, se produce un resultado de 2 y 1 bacterias en la réplica, lo cual según los métodos de análisis microbiológicos es incontable y determina una ausencia de la bacteria. Este resultado coincide con los límites permitidos de 0 UFC/100 ml.

#### 4.4 Determinación del tiempo de inmersión de la Concha Prieta en agua con Acido láctico en Costa Rica (El Oro)

##### ➤ Sector A : Diluvio (cercano a camaroneras)

Muestra inicial directa coliformes fecales:  $11.0 \times 10^4$  UFC

Muestra inicial directa *E. coli*:  $5.0 \times 10^4$  UFC

Los parámetros del agua durante este ensayo fueron:

Temperatura: 22 - 26°C

Salinidad: 32‰

pH (8 – 24 horas): 4.6 - 5.0

pH (48 horas): 5.2

Horas / Muestras	8 horas	12 horas	18 horas	24 horas	48 horas
<b>Muestra A</b> (total de recuento de coliformes fecales)	41	12	2	0	0
Recuento de <i>E. coli</i>	26	15	2	0	0
<b>Replica Muestra A</b> (total recuento de coliformes fecales)	38	18	3	1	0
Recuento de <i>E. coli</i>	20	12	1	0	0

TABLA X. Tiempo de inmersión Sector A (Costa Rica)

De acuerdo a los resultados obtenidos luego del proceso, el tiempo necesario para la depuración de los moluscos del sector A es de 18 horas, esto se debe a que nos lleva a un rango de coliformes fecales y *E. coli* no contable, lo cual se acepta como ausencia.

Los parámetros de salinidad y temperatura durante el proceso de depuración fueron constantes y aceptables, mientras que los de pH variaron de acuerdo al paso de las horas.

➤ **Sector B : Los Chanchos**

Muestra inicial directa coliformes fecales:	$8.2 \times 10^4$ UFC
Muestra inicial directa <i>E. coli</i> :	$4.7 \times 10^4$ UFC

Los parámetros del agua durante este ensayo fueron:

Temperatura:	22 - 25°C
Salinidad:	32 <sup>0</sup> / <sub>00</sub>
pH del agua (8 – 24 horas):	4.3 - 4.8
pH del agua (48 horas):	5.0

Horas / Muestras	8 horas	12 horas	<b>18 horas</b>	24 horas	48 horas
<b>Muestra B</b> (total de recuento de coliformes fecales)	30	16	<b>2</b>	0	0
Recuento de <i>E. coli</i>	16	5	<b>0</b>	0	0
<b>Réplica Muestra B</b> (total recuento de coliformes fecales)	37	18	<b>1</b>	0	0
Recuento de <i>E. coli</i>	10	0	<b>0</b>	0	0

*TABLA XI. Tiempo de inmersión Sector B*

El ensayo del sector B nos demuestra que su carga bacteriana en Coliformes fecales y *E. coli* disminuye completamente a las 18 horas de iniciado el proceso de depuración.

A las 24 y 48 horas no existe presencia de ningún tipo de coliformes; es por esta razón que se asumen las 18 horas como el tiempo ideal para el proceso de este sector.

Los parámetros al igual que el ensayo anterior no variaron significativamente; manteniéndose así dentro de los rangos necesarios para llevar a cabo un sistema depuración. El pH una vez más si desarrolló variables con el paso de las horas.

➤ **Sector C : La Islita (sector ubicado frente a la comunidad)**

Muestra inicial directa coliformes fecales:  $9.7 \times 10^4$  UFC

Muestra inicial directa *E. coli*:  $7.3 \times 10^4$  UFC

Los parámetros del agua durante este ensayo fueron:

Temperatura: 21 - 25°C

Salinidad: 32<sup>0</sup>/<sub>00</sub>

pH del agua (8 – 24 horas): 4.4 - 4.8

pH del agua (48 horas): 5.0

Horas / Muestras	8 horas	12 horas	18 horas	24 horas	48 horas
<b>Muestra C</b> (total de recuento de coliformes fecales)	28	19	3	0	0
Recuento de <i>E. coli</i>	20	10	1	0	0
<b>Réplica Muestra C</b> (total recuento de coliformes fecales)	23	13	0	0	0
Recuento de <i>E. coli</i>	34	16	0	0	0

Tabla XII. Tiempo de inmersión Sector C

El Sector C, registró una cantidad considerable de *E. coli* en relación con los otros dos sectores. Sin embargo, después del proceso de depuración a las 18 horas se logró la eliminación total de todas las bacterias, lo cual nos indica que el ácido láctico además de ejercer su acción bactericida en el agua, también ayuda a la eliminación de las mismas del tracto digestivo de la concha; y con esto se consigue que el molusco esté apto para el consumo humano cumpliendo con las normas de inocuidad alimentaria.

En ninguno de los 3 ensayos, ni a lo largo de las horas de desarrollo del sistema de depuración, se observaron cambios en las características físicas de la *Anadara tuberculosa*, así como tampoco variaciones importantes en la salinidad y temperatura del agua donde se encontraban los animales.

#### **4.5 Características Organolépticas post - depuración**

El análisis sensorial, en el que se comparó un ceviche elaborado con conchas depuradas, contra uno elaborado con conchas sin depurar, permitió determinar que los panelistas no percibieron diferencia en las cualidades de sabor, color, textura, aroma y apariencia general.

Esto quiere decir que el ceviche preparado con conchas depuradas tuvo las mismas cualidades gustativas con respecto al ceviche reconocido como patrón (preparado con

conchas sin depurar), y que el método definido para depurar dichos bivalvos no afecta sus cualidades sensoriales.

De 20 observaciones se requerían 12 aciertos para que la diferencia fuera significativa al 5% de confianza (Pangborn y Pedrero 1989), y únicamente 2 de las observaciones correspondieron a aciertos por parte de los panelistas; es decir que solo 1 persona de 10 en total percibió la diferencia.

Esta persona dijo que no halló diferencias en la textura, color u olor; y que el cambio en el sabor no era significativo y no había variado; simplemente detectó una variante en el sabor sin que esta sea de gran magnitud, lo cual es justificable si se tiene en cuenta que de 10 es la única persona que percibió el cambio.



## CONCLUSIONES

1. El ácido láctico es un compuesto que elimina la presencia de enterobacterias específicamente en un tiempo y concentración considerables sin causar efectos adversos en el animal.
2. La concentración de ácido láctico óptima a usarse para la depuración total del agua, es de 40 ppm en un tiempo de 8 horas para la completa eliminación de cualquier tipo de coliformes presentes.
3. El tiempo promedio de inmersión de las conchas en el sistema de depuración es de 18 horas para los sectores analizados en la comunidad de Costa Rica.
4. El ácido láctico no es tóxico y las conchas pueden soportar su acción por más de 48 horas, incluso la efectividad del ácido disminuye exponencialmente con el paso del tiempo a partir de las 24 horas de depuración.

5. El sistema de depuración basado en ácido láctico, no produce cambios en las características organolépticas del molusco. Esto fue comprobado en la prueba de degustación al no existir más de 1 de entre las 10 personas que detectó la diferencia y la expresó como una variación no significativa en el sabor.
  
6. La preparación de la concentración de ácido láctico es de fácil y sencillo manejo siguiendo los procedimientos ya establecidos; de la misma forma la administración y control del sistema de depuración puede ser realizada por los miembros de la comunidad de recolectores cumpliéndose así uno de los objetivos fundamentales de este proyecto.

## RECOMENDACIONES

1. Probar la eficacia del ácido láctico como desinfectante en otros agentes patógenos presentes en aguas de cultivos acuícolas, tomando como base las pruebas realizadas a las coliformes en este trabajo.
2. Ajustar las horas de inmersión dependiendo del sitio de captura, de acuerdo a los resultados de los análisis realizados antes y después del proceso de depuración.
3. Utilizar este sistema por las comunidades como una forma de mejorar la calidad del producto, y a su vez mejorar sus ingresos.
4. Usar este sistema en peces para lo cual se deberá determinar la concentración adecuada así como el tiempo de inmersión y cambios producidos en los animales.
5. Realizar un diseño y cálculo tentativo para un sistema que pueda usarse en Costa Rica considerando para ello el volumen de captura que poseen.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] C.H. Collins, Patricia M. Lyne., Métodos Microbiológicos: Aribia S.A. Zaragoza (España).
- Peter Feng, Stephen D. Weagant, Michael A. Grant Revised: Bacteriological Analytical Manual, 8th Edition, Revision A, 1998. Chapter 4, .2002-September.
  - Berger, C. 2000. Aportes de la Bio-Tecnología a la Alimentación y a la Inmuno-Estimulación de Camarones peneidos. V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán.
  - Cruz -Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A. y Civera-Cerecedo, R., (Eds.). Avances en Nutrición acuícola. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán.
  - Blagoslawski, W. & Stewart, M. 1983. Depuration and public health. Journal of the World Mariculture Society 41: 535-545.
  - Campos J.A., M.L Fournier & R. Soto. 1990. Estimación de la población de *Anadara tuberculosa* (Bivalvia: Arcidae) en Sierpe-Térraba, Costa Rica. Rev. Biol. Trop. 38:477-480.
  - Cantelmo, F. & Carter, T. 1992. A physiological indicator of hard clam commercial depuration. MTS Journal 23: 9-13.

- Conway, P.L. 1995. Microbial ecology of the human large intestine. In: G.R. Gibson and G.T. Macfarlane, eds. p.1-24. Human colonic bacteria: role in nutrition, physiology, and pathology. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Council Directive (91/492/EEC) - Health Conditions for the Production and Placing on the Market of Live Bivalve Molluscs.
- Cruz, R. & Palacios, J. 1983. Biometría del molusco *Anadara tuberculosa* en Punta Morales, Puntarenas, Costa Rica. Rev. Biol. Trop. 31: 175-179.
- Cruz, R. A. 1982. Tamaño y madurez sexual de *Anadara tuberculosa* (Bivalvia: Arcidae) en Costa Rica. Brenesia. 31: 21-24.
- Cruz, R. A. and J. A. Jiménez. 1994. Moluscos asociados a las áreas de manglar de la Costa Pacífica de América Central: guía. Heredia, C. R. Efun, p. 18–20.
- Ewing, W.H. 1986. Edwards and Ewing's Identification of *Enterobacteriaceae*, 4th ed. Elsevier, New York.
- FEDNA, 2003. Tablas FEDNA de composición y valor nutritivo de alimentos para la formulación de piensos compuestos (2ª ed.). C. de Blas, G.G. Mateos y P.Gª. Rebollar (eds.). Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. Madrid, España. 423 pp.
- Fernández, B. & Brunker, T. 1977. Estudio bacteriológico de bivalvos del Golfo de Nicoya, Costa Rica (I Parte). Rev. Biol. Trop. 25: 101-107.
- Ficha de Datos de Seguridad Merck, Conforme a la Directiva 91/155/CEE de la Comisión, Artículo numero: 100366, Denominación: Acido láctico aprox. 90% purís. Ph Eur, BP, E 270

- Gauthier Dr. Robert D.V.M. dipl. ACPV. Director de Investigación y Desarrollo., Jefe Nutrición Inc. St-Hyacinthe, Qc, Canadá., La Microflora Bacteriana del Tracto Gastrointestinal y los Antibióticos Promotores del Crecimiento
- Keen, A. 1971. Sea shells of tropical West America. 2 ed. California. Stanford University Press.
- Lueck, E. 1985. Antimicrobial food additives. 2 ed. Germany. Springer.
- Madden, R., et al. 1986. Clostridium perfringens as an indicator of hygienic quality of depurated shellfish. Journal of Food Protection 49: 33-36.
- Madrigal, E. et al. 1985. Tasa de filtración del ostión de manglar, (*Crassostrea rhizophorae*, Guilding 1828), a diferentes salinidades y temperaturas. Rev. Biol. Trop. 33: 77-79.
- Manual de Buenas Prácticas de Producción Acuícola de Moluscos Bivalvos para la Inocuidad Alimentaria. Primera Edición; ISBN:968-5384-03-7
- Martínez E., F. Egea, D. Castro, M. Morinigo, P. Romero & J. Barrigo. 1991. Accumulation and depuration of pathogenic and indicator microorganisms by the mollusk *Chlamelea gallina*, under controlled laboratory conditions. J. Food Protection. 54:612-618.
- Mora de Baños, Elba, Departamento de Recursos Pesqueros, Instituto Nacional de Pesca. Guayaquil, Ecuador. Personal commun., November, 1999.
- Neill, M. A., P. I. Tarr, D. N. Taylor, and A. F. Trofa. 1994. *Escherichia coli*. In Foodborne Disease Handbook, Y. H. Hui, J. R. Gorham, K. D. Murell, and D. O. Cliver, eds. Marcel Decker, Inc. New York. pp. 169-213.

- Pangborn, R. & Pedrero, D. 1989. Evaluación sensorial de los alimentos: Métodos analíticos. Alhambra Mexicana. México D.F.
- Rosero, Javier, Chief of Fisheries, Technology Area, Instituto Nacional de Pesca, Letamendi 102 y La Ría, Guayaquil, Ecuador. Personal commun., November, 1999.
- The Fisheries for Mangrove Cockles, *Anadara* spp., from Mexico to Peru, With Descriptions of Their Habitats and Biology, the Fishermen's Lives, and the Effects of Shrimp Farming
- Wong, E. et al. 1996. Efecto de varios agentes, a diferentes niveles de pH, sobre la tasa de filtración de la piangua (*Anadara tuberculosa*). Rev. Biol. Trop. (en prensa).