

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE ACUICULTURA-SEDE YURIMAGUAS



**“EFECTO BIOFILTRO DE LA ALMEJA DE AGUA DULCE (*Anodontites trapezialis*) (Lamarck, 1819) PARA DISMINUIR LOS NIVELES DE COLIFORMES TERMOTOLERANTES EN ESTANQUES PISCÍCOLAS.
Experimento de laboratorio. YURIMAGUAS – PERÚ.**

TESIS

PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE:

BIOLOGO ACUICULTOR

PRESENTADO POR LOS BACHILLERES:

BACH. JAIME SORIA CORDOVA

BACH. JUAN VÍCTOR SÁNCHEZ APAGÜEÑO

YURIMAGUAS - LORETO - PERÚ

2012

MIEMBROS DEL JURADO CALIFICADOR Y DICTAMINADOR

Ing. Eymor Mori Pinedo
CIP 49015
Presidente

Blgo. Werther F. Fernández Rengifo.
CBP 5563
Miembro

Blgo. Wilfredo Alvarado Garzatúa
CBP 5487
Miembro

ASESOR

Blgo. Kennedy Danilo Tarazona Ahuite
CBP 8797



Facultad de Ciencias Biológicas

ESCUELA PROFESIONAL DE
ACUICULTURA SEDE YURIMAGUAS

ACTA DE SUSTENTACIÓN

Tesis titulada “EFECTO BIOFILTRO DE LA ALMEJA DE AGUA DULCE *Anodontites trapezialis* (Lamarck, 1819) PARA DISMINUIR LOS NIVELES DE COLIFORMES TERMOTOLERANTES EN ESTANQUES PISCÍCOLAS. Experimento de laboratorio. YURIMAGUAS-PERÚ” aprobada en sustentación pública el día 03 de setiembre de 2012.

Para optar el Título Profesional de:

BIOLOGO ACUICULTOR

Presentado por los Bachilleres:

JAIME SORIA CORDOVA

JUAN VÍCTOR SÁNCHEZ APAGÜEÑO

Ing. Eymer Mori Pinedo
CIP 49015
Presidente

Blgo. Werther Fernando Fernández Rengifo
CBP 5563
Miembro

Blgo. Wilfredo Alvarado Garazatúa
CBP 5487
Miembro

Blgo. Kennedy Danilo Tarazona Ahuite
CBP 8797
Asesor

DEDICATORIA

A Jehová Dios, creador del universo.

A mis padres, por su apoyo incondicional, por sus consejos, porque siempre quieren que me siga superando, venciendo los obstáculos que nos pone la vida.

A mis amigos y colaboradores que hicieron posible la realización del presente.

AGRADECIMIENTO.

A la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, nuestra Alma Mater; a sus docentes por compartir sus conocimientos, y a los trabajadores administrativos, por facilitarnos los trámites.

Al Blgo. Wilfredo Alvarado Garazatúa, Coordinador de la Escuela de Acuicultura, Facultad de Ciencias Biológicas sede Yurimaguas.

Al Blgo. Kennedy D. Tarazona Ahuite, Docente de la Escuela de Acuicultura, Facultad de Ciencias Biológicas sede Yurimaguas; por su incondicional asesoramiento en todas las etapas del presente trabajo de investigación.

Al señor Juan Elías Flores Dávila, por habernos brindado los ambientes de su casa, para la ejecución de este trabajo de investigación y por su constante apoyo en el trabajo.

A la Blga. Rosa Guevara Vásquez, encargado del laboratorio de control ambiental de la DIGESA yurimaguas.

A nuestro Jurado Calificador Ing. EymerMori Pinedo,Blgo. Wilfredo Alvarado Garazatua y al Blgo. Werther Fernando Fernández Rengifo; por sus acertadas correcciones.

A todos mil gracias.

INDICE

CAPÍTULO.	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	12
II. OBJETIVOS	13
III. REVISIÓN DE LITERATURA	14
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	19
V. RESULTADOS Y DISCUSIONES	30
VI. CONCLUSIONES	36
VII. RECOMENDACIONES	37
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
IX. ANEXOS	46

LISTA DE GRÁFICOS

	Pág.	
Gráfico 1.	Procedimiento por filtración por membrana	24
Gráfico 2.	Procedimiento para coliformes por MFC solo con agua de fuente	25
Gráfico 3.	Fermentación en tubos múltiples	28

LISTA DE FIGURAS

	Pág.	
Figura 1.	Disminución de coliformes por efecto de la densidad de <i>Anodontites trapezialis</i>	32
Figura 2.	Digestión de la carga bacteriana en <i>Anodontites trapeziales</i>	35

LISTA DE TABLAS

		Pág.
Tabla 1.	Tenores promedio de la calidad del agua de estanques en el eje carretero Yurimaguas-Tarapoto.	30
Tabla 2.	Resultados de los análisis de calidad de los estanques.	31
Tabla 3.	Reducción de la carga bacteriana en 24 horas.	33
Tabla 4.	Reducción de la carga bacteriana en 48 horas	33
Tabla 5.	Reducción de la carga bacteriana en 72 horas	34

ANEXOS

	Pág.	
Anexo 1.	Ficha de procedimiento de análisis para numeración de coliformes	47
Anexo 2.	Fotos de la colecta de almejas en estanques en el Km 45 carretera Yurimaguas-Tarapoto	48
Anexo 3.	Fotos de la distribución de las almejas en los acuarios para experimentación.	48
Anexo 4.	Fotos del control y seguimiento	49
Anexo 5.	Fotos de la prueba de laboratorio. Método: filtración por membrana	50
Anexo 6.	Fotos de los resultados obtenidos a las 24 horas	52
Anexo 7.	Fotos de los resultados obtenidos a las 48 horas	52
Anexo 8.	Fotos de los resultados obtenidos a las 72 horas	53
Anexo 9.	Fotos de toma de muestra visceral	54
Anexo 10.	Fotos de prueba de laboratorio. Método por tubos múltiples	55
Anexo 11.	Fotos de la toma de muestra de agua para análisis bacteriológico	58
Anexo 12.	Fotos de medida de los parámetros físico-químicos de las muestras	58

RESUMEN

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Control ambiental de la DIGESA (Dirección General de Salud Ambiental) Yurimaguas, localizado en la ciudad de Yurimaguas Provincia de Alto Amazonas teniendo como objetivo, evaluar en el laboratorio la Capacidad del *Anodontites trapezialis* para digerir la carga bacteriológica del agua de los estanques y conocer el efecto de la densidad de siembra de *Anodontites trapezialis* en la disminución de coliformes fecales en peceras. El Diseño del experimento obedeció a un método experimental, ajustado a tres (3) tratamientos y un control con tres réplicas cada uno. Para determinar la densidad poblacional Coliformes termotolerantes, por cada unidad tratamiento, se aplicó el método por filtración de membrana (ufc/ml). Se usó doce (12) peceras de vidrio con capacidad hasta 60 litros, se colocaron almejas adultas del mismo tamaño en densidades de 30, 45 y 60 individuos en 30 litros de agua de estanque. De lo que se concluye lo siguiente: La almeja *Anodontites trapezialis* es capaz de reducir el número de Coliformes termotolerantes, hasta desaparecerla del agua de los estanques, usando densidades de 30, 45 o 60 por cada 30 litros de agua. Que cuanto mayor el tiempo de uso de las almejas en el estanque, mayor es la capacidad de síntesis de los coliformes termotolerantes.

I. INTRODUCCIÓN

Diversos estudios señalan el importante rol que cumplen las almejas de agua dulce en los ecosistemas naturales (Anthony & Downing 2001), se trata de organismos eficientes como bombeadores (Kryger & Riigard 1988) y filtradores (Hebert *et al.* 1991). *Diplodon chilensis* (Gray 1828) es una almeja común en lagos y ríos del centro-sur de Chile y Argentina. En lagos y ríos de la Amazonia las almejas constituyen un componente importante del macrozoobentos por su presencia (Viozzi & Brugni 2001), abundancia y biomasa (Parada 1987). Tienen la capacidad de colonizar sustratos arenosos, areno-pedregosos y fangosos alcanzando densidades variables y crecientes desde 10 ind/m² en sustratos arenosos a 361 ind/m² en sustratos fangosos (Lara y Parada 1988). También la almeja ha demostrado capacidad de bombeo (Busse 1970) y de filtración de partículas (Valdovinos & Cuevas 1996, Soto & Mena 1999) y de bacterias (Sepúlveda 1988, Vallejos y Delucchi 2001).

La alta cantidad de coliformes fecales de hasta 5.400 NMP en 100 ml registrada en aguas de pozos, la plasticidad de *Anodontites trapezialis* para vivir en distintos ambientes dulceacuícolas (Parada 1987) y su capacidad de bombeo y de filtración, motivaron la realización de este trabajo cuyo objetivo es evaluar, experimentalmente en laboratorio, la eficiencia para disminuir y digerir la carga de coliformes de aguas de estanque con problemas de contaminación fecal.

II. OBJETIVOS

GENERAL

Determinar el efecto de la almeja de agua dulce *Anodontites trapetialis* en la disminución de *Coliformes termotolerantes*, en aguas de producción acuícola.

ESPECÍFICOS

1. Evaluar en el laboratorio la Capacidad de *Anodontites trapetialis* para digerir la carga bacteriológica.
2. Efecto de la densidad de siembra de *Anodontites trapetialis* en la disminución de coliformes fecales en peceras.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

Boyd, (1995) recomienda la aplicación de buenas prácticas de manejo en estanques piscícolas como una vía para mejorar la calidad y reducir el volumen de contaminantes en el agua.

Estas prácticas son el medio más efectivo para reducir la polución y otros impactos ambientales, especialmente en la calidad del agua. Son frecuentemente denominadas como Mejores Prácticas de Manejo (BMPs). Algunas BMPs para prevenir la polución del agua son: No usar tasas de siembra ni de alimentación superiores a la capacidad de carga del efluente; usar prácticas de alimentación conservadoras evitando la sobreoferta; fertilizar solamente lo necesario para promover el fitoplancton; reducir el recambio de agua tanto como sea posible; cosechar sin drenar el estanque y pasar el efluente por un tanque de sedimentación antes de la descarga final. La aplicación de BPM puede reducir las entradas de nutrientes, la resuspensión de sedimentos, la erosión y mejorar las concentraciones de oxígeno disuelto. También modera el pH y las concentraciones totales de nitrógeno amoniacal en el agua de los estanques dando como resultados efluentes de mejor calidad. En muchas granjas, la sola aplicación de las BPM no será suficiente para disminuir las concentraciones totales de sólidos suspendidos y fósforo a los límites establecidos en las normas de efluentes típicos (Boyd, 1995).

Martínez Córdova *et al.* (1996), cultivaron camarones y almejas en conjunto y comprobaron que la presencia de moluscos ayudó a mejorar la calidad del agua en la descarga.

Jones (1999) indica que el uso de las ostras como biofiltros puede mejorar la calidad del agua de los estanques. Después de la filtración por las ostras, la mayoría de los nutrientes son depositados como heces, mientras que el resto es incorporado en los tejidos de las ostras.

Gifford (2004) evaluaron el potencial de la ostra perlífera *Pinctada* como parte de una nueva tecnología de bioremediación para sitios impactados, con la finalidad de remover los contaminantes tóxicos, reducir la carga de nutrientes y disminuir las concentraciones de patógenos microbianos. Basado en estimaciones de la literatura, estos autores sugieren que una modesta granja de cultivo de ostras perlíferas de 100 t de ostras por año, puede remover 300 kg de metales pesados, 24 kg de contaminantes orgánicos vía depósito en sus tejidos y conchas, Además estimó que hasta 19 kg de nitrógeno puede ser removido del ecosistema costero por tonelada de ostra perlífera cosechada.

Miranda–Baeza (2005) cultivó a la pata de mula *Anadara tuberculosa* en los efluentes de una granja de camarón obteniendo altas tasas de crecimiento y

baja mortalidad; sin embargo ésta es una especie de crecimiento lento, con preferencia por el sustrato lodoso que limitaría su uso a una región del Golfo de California. En cultivos combinados de camarón (*Litopena eusvannamei*), ostión (*Crassostrea gigas*) y almeja (*Chione fluctifraga*) los bivalvos ayudaron a mejorar la calidad del agua de descarga (Martínez–Córdova *et al.*, 1996).

Martínez–Córdova, (2006). Cultivaron al ostión japonés *Crassostrea corteziensis* en canales de descarga en un ciclo de cultivo de camarón, obteniendo la mayor producción del bivalvo previo al verano. Los bivalvos *C. corteziensis*, *A. tuberculosa*, y *M. strigata* removieron partículas de los efluentes de una granja con diferencias inherentes a su fisiología (Messina, 2009).

Ramos, (2008), evaluaron las eficiencias de remoción del material particulado y nutrientes disueltos desde efluentes de cultivo de *Litopenae usvannamei*, utilizando un sistema combinado de dos fases, sedimentación y filtración por la ostra *Crassostrea rhizophorae*, empleando tres tiempos de retención hidráulica (TRH) del efluente, 6, 12 y 24 h.

Messina,(2009), evaluó la eficiencia de filtración del mejillón de canal (*Mytellastrigata*), del ostión de Cortéz (*Crassostrea corteziensis*) y de la almeja

pata de mula (*Anadara tuberculosa*) así como la capacidad de absorción de nutrientes de la halófito *Salicornia sp.* y de la macroalga *Cauler paracemosa* presentes en la región costera de San Blas, Nayarit,

El cultivo integrado del mejillón verde *Perna viridis* en los desechos de los estanques usados para el cultivo intensivo del camarón *Litopenae usvannamei* fue estudiado por Kwei (1993). Los experimentos se condujeron a escala piloto durante 100 días. La sobrevivencia del camarón fue del 85%, el peso de la carne se incrementó de 6.9 a 28.9 g y el peso individual promedio de las almejas se incrementó de 12.2 a 42.4 veces; estos últimos organismos fueron cultivados en el canal del drenaje.

Busse (1970) ha demostrado la capacidad de bombeo de la tumbacuchara o almeja de agua dulce, como un comportamiento natural en su hábitat.

Valdovinos & Cuevas (1996), Soto & Mena (1999), han demostrado la capacidad de filtración de partículas en laboratorio con muestras de aguas con alta carga de sedimento.

Sepúlveda (1988), Vallejos y Delucchi (2001), han demostrado la capacidad de filtración de bacterias usando agua de pozo.

Lara y Parada (1988), han demostrado la capacidad de la tumbacuchara o almeja de agua dulce, de colonizar sustratos arenosos, areno-pedregosos y fangosos alcanzando densidades variables y crecientes desde 10 ind/m² en sustratos arenosos a 361 ind/m² en sustratos fangosos.

Parada (1987), demuestra que la tumbacuchara o almeja de agua dulce presenta una alta plasticidad para vivir en distintos ambientes dulceacuícolas

Kryger & Riigard (1988), han demostrado que la almeja de agua dulce son eficientes bombeadores.

Hebert *et al.* (1991) y Turick *et al.* (1988), han demostrado que la almeja de agua dulce son eficientes filtradores.

Durán *et al.* (1999), en estudios realizados en agua de pozo como fuente de consumo de las comunidades rurales, han encontrado un alta carga de coliformes fecales de hasta 5.400 NMP valor por encima de los límites permisibles según la norma Chilena, valor que también es excesiva o fuera de los rangos establecidos por DIGESA – Perú.

Sepúlveda (1988), en un estudio realizado en el río Calle de la ciudad de Valdivia detectó bacterias fecales, en la cavidad digestiva de la tumbacuchara.

Vallejos y Delucchi (2001), demostró la capacidad depuradora de aguas servidas de la tumbacuchara.

Gladys Lara, Angel Contreras y Francisco Encina (1999), en estudios realizados en comunidades rurales de Chile, donde habitan familias que se abastecen con agua de pozo, y donde se han detectado índices de coliformes fecales de hasta 5400 NMP en 100 ml, especialmente en pozos de baja profundidad, realizaron una investigación tendiente a evaluar en el laboratorio la capacidad de las almejas para disminuir los niveles de coliformes en aguas de pozo así como de digerir la carga bacteriológica. Los resultados de los experimentos llevaron a concluir que densidades de 15 y 25 ejemplares en 30 litros de agua fueron capaces de disminuir la turbidez del agua y el número más probable de coliformes en un período de 6 horas siendo además capaces de digerirlas.

IV. MATERIALES Y METODOS

4.1 Ubicación del Área de estudio

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Control ambiental de la DIGESA (Dirección General de Salud Ambiental) Yurimaguas, localizado en la ciudad de Yurimaguas Provincia de Alto Amazonas, Departamento de Loreto, que se encuentra ubicada a una Altitud de 181.51 m.s.n.m., con una Longitud de 78°11'22" 9 W, Latitud de 03°30'17" 3 S, y posee una densidad poblacional de 22.77 Hab./Km².

El clima es bosque húmedo tropical, como promedio de humedad relativa del 85%, temperatura media de 26 °C y precipitación pluvial de 2,200 mm.

4.2 Especie utilizada

Anodontites trapezialis es un molusco bivalvo que pertenece a la familia **MYCETOPODIDAE**. Sus conchas son fuertes triangulares especialmente en adultos. Las valvas generalmente presentan un típico brillo porcelanizado, y la superficie de estas presentan estrías concéntricas (Foto 1).



Foto 1. Carácter externo de la almeja

La especie forma parte de la siguiente estructura taxonómica:

Clase : BIVALVIA

Subclase : PALEOHETERODONTA

Orden : UNIONOIDA

Superfamilia : MUTELLACEA

Familia : MYCETOPODIDAE

Especie : *Anodontites trapezialis* (Lamarck, 1819)

Esta almeja, puede encontrarse desde los sedimentos arenosos a fangosos, es capaz de tolerar amplios rangos de salinidad desde aguas completamente dulces hasta casi marinas (25 %) (García, 1984; García de Severeyn y col., 1994). La tasa de filtración máxima es de 1.56 Lt/h (Muñoz, 2002).

4.3 Muestra patrón de agua

Para obtener un patrón de calidad de agua de estanques piscícolas, se colectó una muestra de agua de estanques seleccionados en el Km 08 (E1) y el Km

45 (E2) ubicados en la carretera Yurimaguas-Tarapoto respectivamente, Se colectaron muestras de agua de 1 litro cada una, la que se procesó en el Laboratorio de Control Ambiental de la DIGESA.

Los parámetros medidos fueron: pH, turbiedad (NTU), Oxígeno disuelto, Salinidad.

4.4 Diseño del experimento

El experimento obedeció el siguiente diseño:

- a). Densidad de almejas (tumbacuchara) *Anodontites trapezialis* respecto disminución de la carga bacteriológica.

El diseño experimental se ajustó a tres (3) tratamientos y un control con tres réplicas cada uno.

To = Testigo, 30 litros de agua + inóculo (una cepa pura de Coliformes *termotolerantes*) y sin almejas

T1 = Tratamiento uno (1), 30 litros de agua + inóculo (una cepa pura de coliformes termotolerantes) + 30 unidades de almejas

T2 = Tratamiento dos (2), 30 litros de agua + inóculo (una cepa pura de coliformes termotolerantes) +45 unidades de almejas

T3 = Tratamiento tres (3), 30 litros de agua + inóculo (una cepa pura de coliformes termotolerantes) +60 unidades de almejas

- a.1 Método de análisis para la determinación de la densidad poblacional de Coliformes termotolerantes en las unidades experimentales.

Para determinar la densidad poblacional Coliformes termotolerantes, por cada unidad tratamiento, se aplicó el método por filtración de membrana (ufc/ml).

- a.2 Distribución y procedimiento del experimento

En doce (12) peceras de vidrio con capacidad hasta 60 litros, se colocaron almejas adultas del mismo tamaño en densidades de 30, 45 y 60 individuos en 30 litros de agua de estanque, con muestras recogidas de estanques piscícolas de ubicadas en el Km 45 de la carretera Yurimaguas-Tarapoto pertenecientes al Señor Alberto Huamanjulca Silva. A las 24horas, se extrajeron muestras de agua en cada réplica para estimar la efectividad parcial de las almejas para retener bacterias

Coliformes fecales. El recuento de bacterias de *Coliformes fecales*, se estimaron a través de la técnica de filtración de membrana en unidades formadoras de colonia (ufc) (APHA AWW,WEF,2005). La comparación del recuento bacteriológico promedio en el agua de tratamientos (30, 45 y 60) en relación al control (agua de estanque sin almejas) se hizo para cada lapso de tiempo, mediante los test Tukey (a 0.05).

a.3 Disposición de los tratamientos

Tabla N° 01. Disposición de los tratamientos

Repeticiones	Tratamientos				Total
	T0	T1	T2	T3	
A	0	30	45	60	135
B	0	30	45	60	135
C	0	30	45	60	135
Total	0	90	135	180	405

b) Análisis de Laboratorio

Filtración por membrana para Coliformes termotolerantes

Consistió en la búsqueda de bacterias que forman parte del grupo Coliforme, bacilos gram – negativos, que fermentan la lactosa con producción de ácido y gas a $44.5 \pm 0,2$ °C dentro de las 24 ± 2 hrs. La especie representativa en el grupo de coliformes termotolerantes es la *E. Coli*.

Recuento de Unidades Formadores de Colonias (UFC)

Se contó el número mínimo de células separables sobre la superficie, o dentro del medio de agar que da lugar al desarrollo de una colonia visible del orden de decenas de millones de células descendientes. Las UFC pueden ser pares, cadena o racimos, así como células individuales. Las “Unidades Formadoras de Colonias” (UFC) se miden en UFC/ml, UFC por mililitro.

Recuento de Coliformes fecales

Se calculó la densidad sobre la base del número de colonias típicas contadas sobre la membrana filtrada, el volumen filtrado y la dilución de la muestra.

La densidad bacteriana se obtuvo a través de una fórmula validada y se expresa como UFC de Coliformes Totales /100 ml.

Procedimiento por filtración por membrana

Grafico 01.

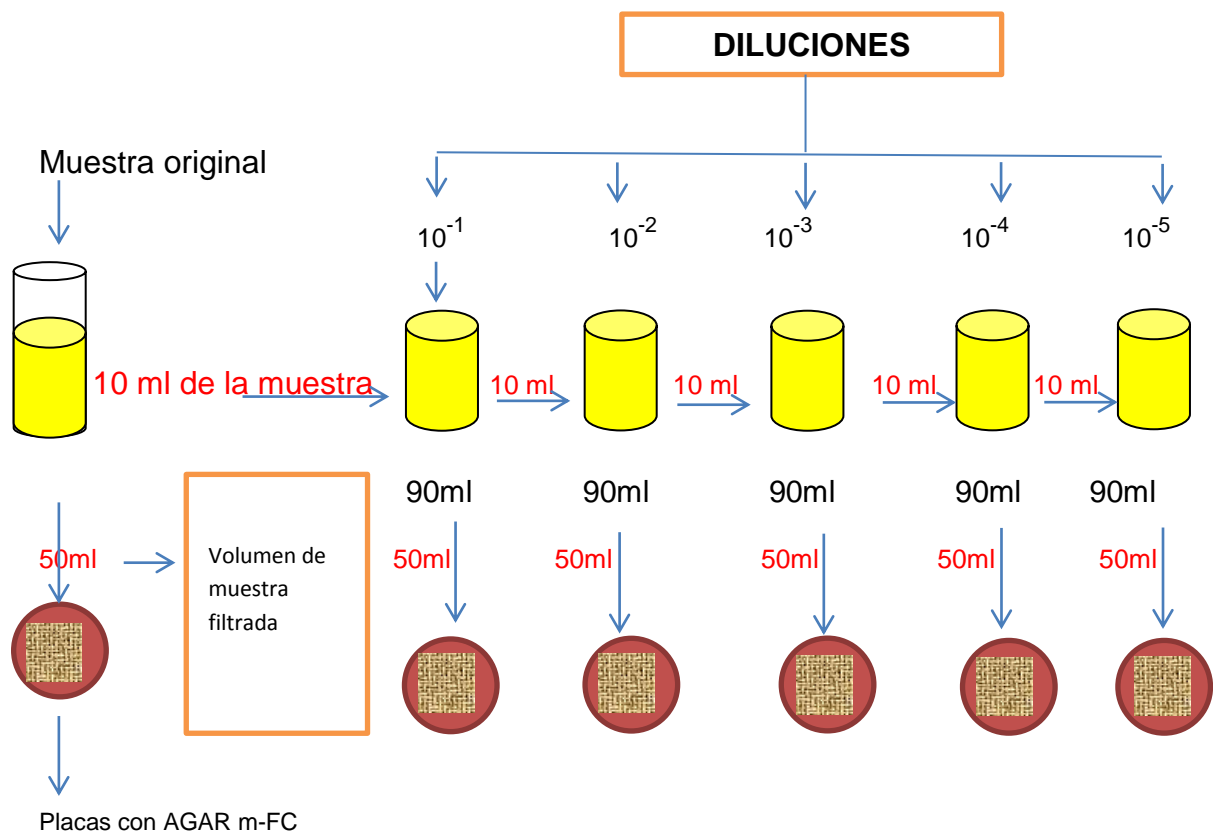
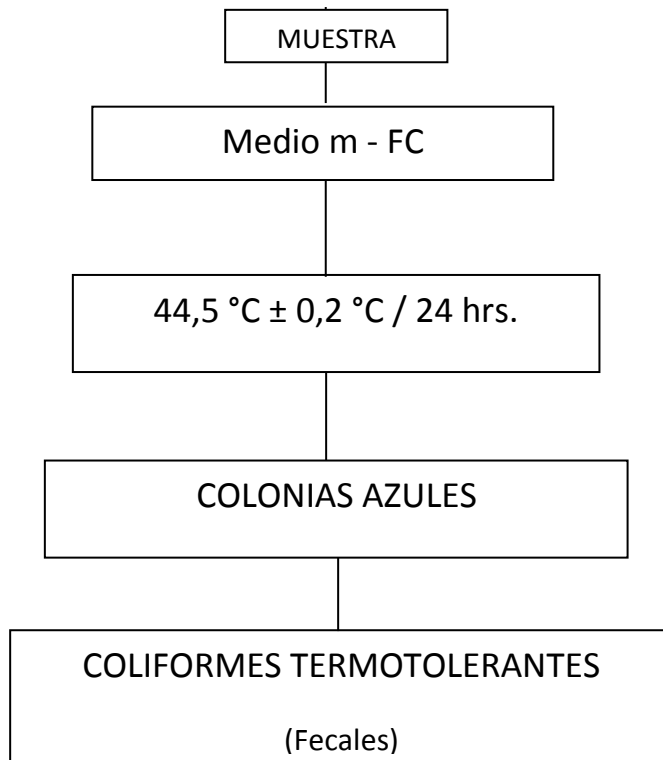


Grafico 02. Procedimiento para coliformes por MFC solo con agua de la fuente



- c). Capacidad de *Anodontites trapezialis* para digerir la carga bacteriológica.

Para probar si las almejas, independientemente de su densidad, son capaces de digerir bacterias, previamente aclimatadas para descartar los factores de estrés. De cada réplica se extrajeron una muestra de 10 g de masa visceral correspondiente al estómago e intestino de las almejas, a fin de cuantificar las bacterias *Coliformes fecales* presentes en los especímenes mediante la técnica por tubos múltiples. Se comparó la concentración y densidad de las bacterias en la masa visceral y en el

agua en que se encontraron las almejas. Una vez comprobado la presencia de bacterias realizó un cultivo de *E. coli* para obtener más cepas para inocular en las peceras.

Los niveles obtenidos se constataron con las normas de DIGESA y comparados el número de *Coliformes* totales y fecales con la prueba t de Student (a 0.05).

Este análisis se divide en dos etapas la Prueba presuntiva y Prueba confirmativa.

c.1 Prueba presuntiva

Preparar una batería con series de cinco tubos conteniendo 10 ml de CLS de concentración doble y series de cinco tubos con 10 ml CLS de concentración simple, codificar los tubos con el número asignado a la muestra, volumen a inocular. Cuando la muestra no contiene cloro residual o es turbia se procede a realizar las diluciones respectivas.

La muestra se debe agitar vigorosamente más o menos unas 25 veces antes de ser analizada. Se inoculara 10 ml de la muestra a un frasco conteniendo 90 ml de agua de dilución para realizar la dilución 10-1, luego se toma 10 ml de la primera dilución y se coloca en un segundo frasco con 90 ml de agua de dilución obteniéndose 10-2, se sigue realizando la misma operación hasta obtener la dilución que se necesita para trabajar 10 n. Cuando se trabaja con diluciones se procede a

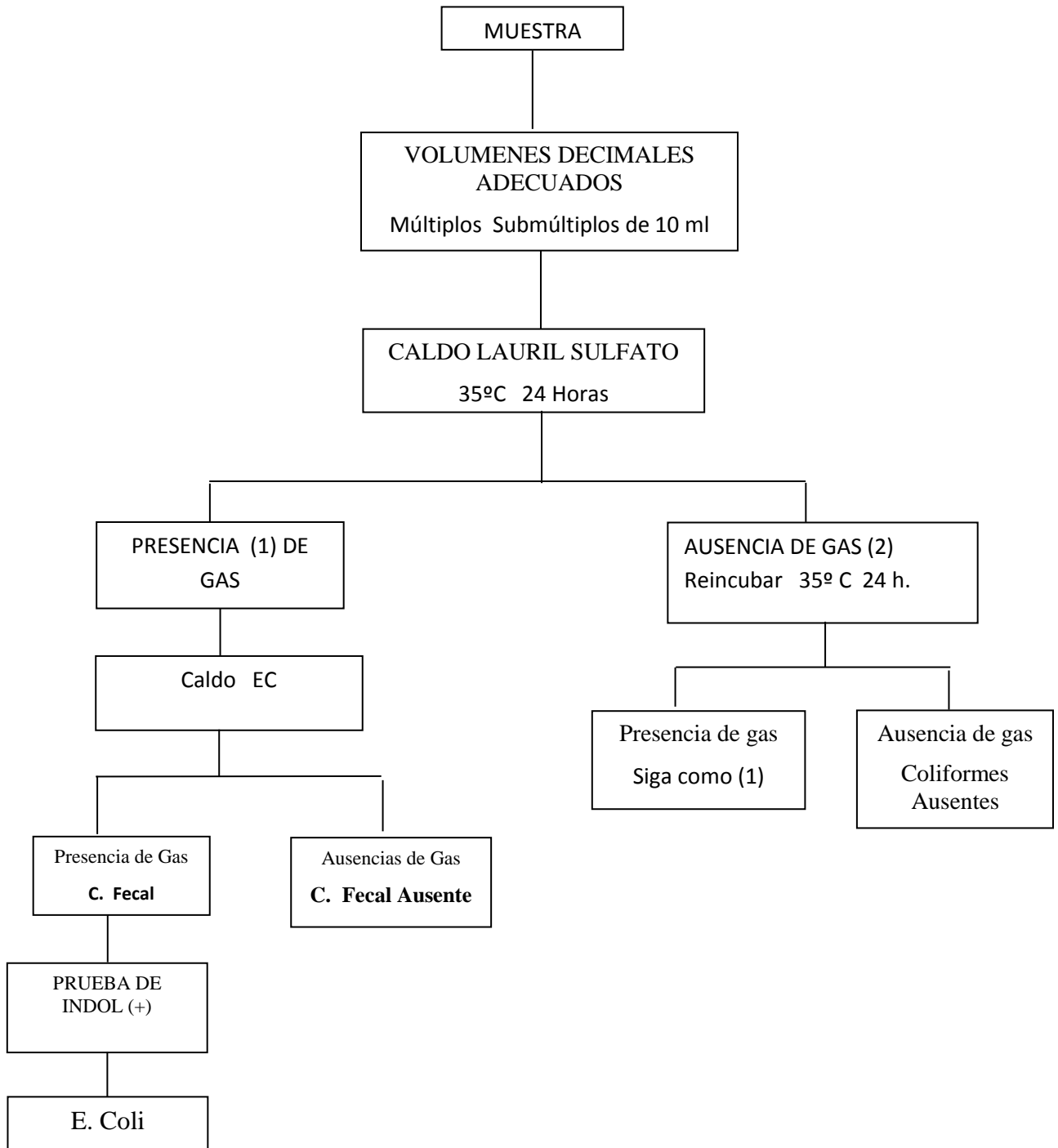
sembrar de la dilución mayor a la menor. Sembrar 10 ml de la muestra original en cinco tubos de concentración doble y 1 ml de la muestra en cinco tubos de concentración simple de CL, en los tubos siguientes se siembra 1 ml de la dilución correspondiente. Incubar los tubos por 24 ± 2 horas a $35 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$, se realiza la primera lectura a las 24 h, los tubos positivos pasan a la prueba confirmativa. Los tubos positivos son aquellos que presentan formación de gas, turbiedad y fermentación, los tubos negativos se llevan a incubar por 24 horas más. Realizar la segunda lectura, separar y anotar los tubos positivos y pasarlos a la prueba confirmativa, los tubos negativos se descartan.

c.2 Prueba confirmativa

Los tubos positivos se siembran en caldo EC a los cuales se les codifica con el número correspondiente del tubo positivo de CLS de la prueba presuntiva. Los tubos de CLS positivo se agitan antes de tomar el inóculo, con la asa de siembra previamente esterilizado y enfriado, extraer una asada del material e inocular en el tubo de EC. Los tubos de caldos EC se incuban a $44,5 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 horas en baño maría. Proceder a la lectura luego del tiempo de incubación, los tubos de caldo EC, que presentan turbiedad, fermentación y formación de gas son considerados positivos confirmando la presencia de coliformes termotolerantes (fecales).

FERMENTACION EN TUBOS MULTIPLES
COLIFORMES FECALES (TERMOTOLERANTES)

Grafico 03



d. Diseño estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el Diseño Completamente al Azar (DCA), con tres tratamientos y un control con tres repeticiones para cada tratamiento, dando un total de 12 unidades experimentales (peceras). Los resultados han sido sometidos al análisis de varianza y la prueba de Tuckey ($\alpha = 0,05$); Los datos fueron analizados con ANOVA para observar se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 CALIDAD DEL AGUA DE LOS ESTANQUES DE REFERENCIA

5.1.1 Parámetros Físico-químicos

Para tener una visión más amplia del comportamiento de los estanques se muestrearon varios puntos importantes. De acuerdo a esto, la temperatura, salinidad, pH, O₂ y STD no presentaron variabilidad en los estanques monitoreados, como se muestra en la Tabla 1.

Tabla N° 01. Tenores promedio de la calidad del agua de estanques en el eje de la carretera Yurimaguas-Tarapoto.

Muestra	Ph	Tº	O ₂	Turbiedad	Salinidad
Km 08	6.9	29	3.5	16	0.5
Km 45	7.15	28.54	4.0	14.8	0.5

Fuente: Ficha de registro

La tabla 1, pone de manifiesto un bajo tenor de O₂, un pH casi neutro, baja salinidad, valores medios de y una Temperatura moderada.

5.1.2 Calidad bacteriológica del agua de los estanques

Los estanques muestreados en cuanto a calidad microbiológica, presentan el siguiente comportamiento.

Tabla N° 02. Resultados de los análisis de calidad de los estanques

Numero de Diluciones E1 y E2				
10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
DNPR	DNPR	DNPR	DNPR	100

DNPR = Demasiado Número para el Recuento
E1 y E2 = Estanques

En la Tabla N° 02, se observa una gran cantidad de carga bacteriana en el agua de los estanques muestreados, de los que se obtuvo la muestra para el experimento.

5.2 Biofiltración de Coliformes termotolerantes por *Anodontites trapezialis*

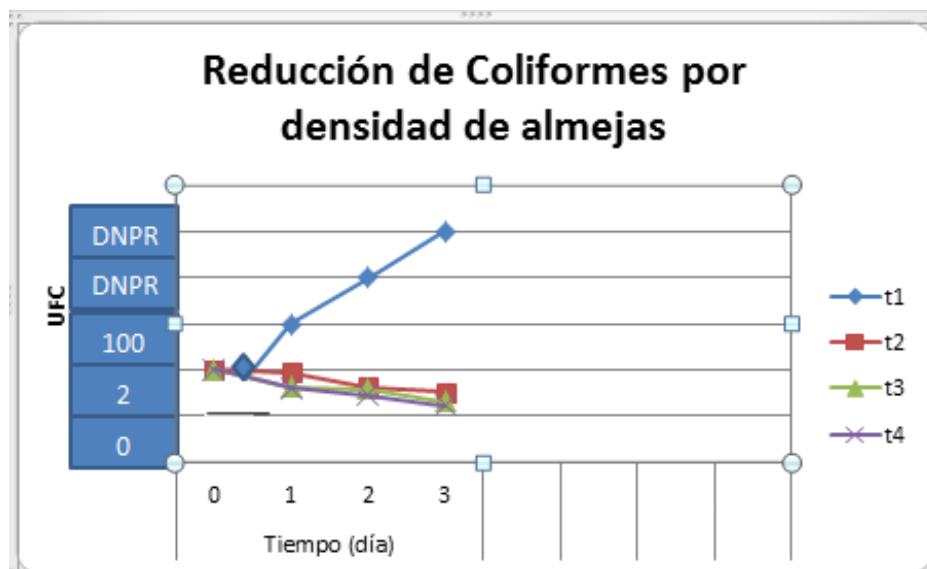
Las concentraciones de *C. termotolerantes* usando la almeja *Anodontites trapezialis* con las diferentes densidades estudiadas, mostraron que existen diferencias significativas con respecto al control (P=) (Figura 9). Estos resultados indican que durante los diferentes tiempos y densidades evaluados se obtuvo disminución de la concentración de Coliformes termotolerantes.

5.2.1 Efecto de la densidad de siembra del *Anodontites trapesialis* en la reducción de la carga bacteriana

El efecto de la densidad, 30, 45 y 60 almejas en 30 litros de agua de estanque en pecera con una muestra que reporta “Demasiado Número para el Recuento”

(DNPR) ufc, indica que a las 24 horas de iniciado el experimento ocurrió una clara disminución de éstas. La diferencia se hizo más notoria con respecto al control (sin almejas) desde las 48 hasta las 72 horas ($P < 0.05$) (Figura 1). Cabe hacer notar que en el tiempo que duró el experimento, ambas densidades fueron igualmente eficientes en disminuir las bacterias aeróbicas mesófilas ($P > 0.05$). A continuación los resultados de los tratamientos (T1; T2, T3 y T4).

Figura 1. Disminución de coliformes por efecto de la densidad de *Anodontites trapezialis* en 72 horas.



Fuente : Ficha de registro

La tabla N° 03 pone de manifiesto una disminución significativa de Coliformes termotolerantes en un periodo de 24 horas.

Tabla N° 03. Reducción de la carga bacteriana en 24 horas.

Ttos (Densidad)	Numero de Diluciones				
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
30	DNPR	DNPR	DNPR	100	50
45	DNPR	DNPR	100	70	30
60	DNPR	100	60	40	5

DNPR = Demasiado Número para el Recuento

Tabla N° 04. Reducción de la carga bacteriana en 48 horas.

N° de indiv.	Numero de Diluciones				
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
30	DNPR	100	70	40	10
45	100	65	30	15	3
60	60	30	10	0	0

Fuente: Ficha de Registro

La tabla N° 04 pone de manifiesto una disminución significativa de Coliformes termotolerantes en un periodo de 48 horas.

Tabla N° 05. Reducción de la carga bacteriana en 72 horas.

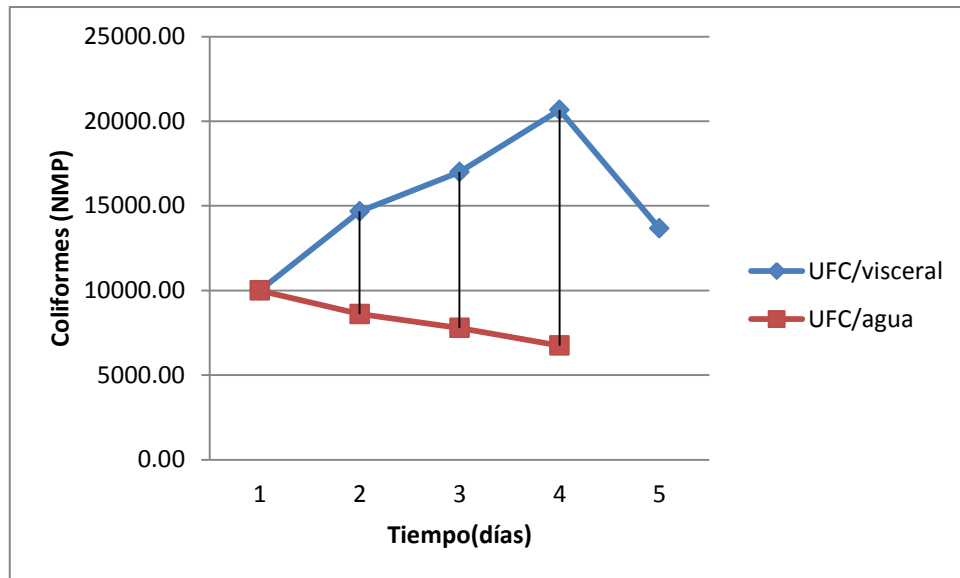
N° de indiv.	Numero de Diluciones				
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
30	60	30	10	3	0
45	20	14	2	0	0
60	2	0	0	0	0

Fuente: Ficha de Registro

La tabla N° 05 pone de manifiesto una disminución significativa de Coliformes termotolerantes en un periodo de 72 horas, llegando a valores de cero unidades formadoras de colonia.

5.3 Capacidad de *Anodontites trapezialis* para digerir la carga bacteriológica.

Respecto a la capacidad de las almejas para digerir bacterias, en la Figura N° 02, se observa que si bien la cantidad de coliformes totales en el agua de estanque disminuye, ésta aumenta en la masa visceral de las almejas pero conforme se digieren las bacterias éstas tienden a desaparecer; finalmente, por falta de bacterias en el agua disminuyen definitivamente en la masa visceral.

Fig N° 02. Digestión de la carga bacteriana en *Anodontites trapezialis*

Fuente : ficha de registro

DISCUSION

Por lo anteriormente señalado este estudio comprueba que el *Anodontites trapezialis* al igual que otros moluscos bivalvos dulceacuícolas (Imlay & Paige 1972), estuarinos (Newell 1965) y marinos (Birkbeck & Mc Henery 1982), tiene la capacidad de digerir bacterias las cuales constituirían parte de su dieta, aportándoles energía y un alto contenido proteico.

Sepúlveda (1988), en un estudio realizado en el río Calle de la ciudad de Valdivia detectó bacterias fecales, en la cavidad digestiva de la tumbacuchara, corroborando los resultados obtenidos en nuestra investigación.

VI. CONCLUSIONES

- La almeja *Anodontites trapezialis* es capaz de reducir el número de Coliformes termotolerantes, hasta desaparecerla del agua de los estanques, usando densidades de 30, 45 o 60 por cada 30 litros de agua.
- Cuanto mayor el tiempo de uso de las almejas en el estanque, mayor es la capacidad de síntesis de los coliformes termotolerantes
- Hay un efecto inicial sobre los coliformes termotolerantes, mientras que, por un lado el número se reduce drásticamente; por otro lado se incrementa a nivel de vísceras hasta que la almeja logre sintetizar a partir de las 24 horas de ingerido los microorganismos.

VII. RECOMENDACIONES

Los resultados obtenidos apoyan la idea de emplear a la almeja de agua dulce *Anodontites trapezialis* como un biofiltro, en la actividad acuícola para mejorar la calidad del agua.

Las almejas por sus características poblacionales, como alta densidad, ciclo de vida largo, plasticidad para vivir en variados ambientes y tamaño individual constituiría una inversión de bajo costo y de fácil manipulación en un cultivo comercial.

I. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Anthony, J.L. & J.A. Downing. 2001. Exploitation trajectory of a declining fauna: a century of freshwater mussel fisheries in North America. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 58: 2071 - 2090.
- Birkbeck, T.H. & J.G. McHenry. 1982. Degradation of bacteria by *Mytilus edulis*. *Marine Biology* 72: 7-15.
- Bonetto, A.A. 1973. Náyades de la Patagonia. *Rev. Asoc. Cienc. Nat. Litoral.* 4: 177-185.
- Boyd, C.E. 1995. Soil and water quality management in aquaculture ponds. *INFOFISH* 5/95:29-36.
- Busse, K. 1970. Nuevo método para medir flujos de agua producidos por organismos filtradores. Medición experimental en *Diplodon chilensis* (Gray), 1854 (Mollusca, Lamellibranchiata). *Not. Mens. Mus. Historia Natural. Santiago.* 172: 3-10.
- Dame R, Dankers N, Prins T, Jongsma H, Smaal A. 1991. The influence of mussel beds on nutrients in the Western Wadden Sea and Eastern Scheldt Estuaries *Estuaries*; 14: 130-138.

- Di Girolamo R., Liston J., Matches J. 1977. Ion bonding, the mechanism of viral uptake by shellfish mucus. *Appl Environ Microbiol*, 33(1):19-25.
- Duran, T., L. Fernández., N. Carrasco & H. Mora. 1999a. Mejoramiento de la calidad y abasto de agua en cuatro comunidades mapuches de Maquehue, IX Región, Chile. Informe Final IDRC.
- García, Y. 1984. Biología y Ecología de *Polymesoda artata* (Deshayes) almeja presente en el Lago de Maracaibo. Trabajo Especial de Grado. La Universidad del Zulia. Facultad Experimental de Ciencias. Dpto. de Biología. Maracaibo. 125pp.
- García de Severeyn, Y., Severeyn, H. and Ewald, J. 1994. Early development of the estuarine clam, *Polymesoda solida* (Bivalvia: Corbiculidae), in Lake Maracaibo, Venezuela. *Bull. Am. Malacal. Union*, 11: 56-62.
- Gifford, S., R. Dunstan, W. O'Connor, T. Roberts y R. Toia. 2004. Pearl aquaculture—profitable environmental remediation?. *Science of The Total Environment*. 319(1-3): 27-37.

- Gladys Lara, Angel Contreras y Francisco Encina. 1999. Proyecto 99.4.02, Dirección de Investigación de la Universidad Católica de Temuco. Depto. de Cs. Biológicas y Químicas
- Hebert, P.T., C. Wilson., M.H.Murdoch&R.Lazar. 1991. Demography and ecological impacts of the invading mollusk, *Dreisseniapolymorpha*. *Can. J. Zool.* 69: 405-409.
- Hopkins, J. S., Hamilton, R. D., II, Sandifer, P. A., Browdy, C. L. & Stokes, A. D. 1993. Effect of water exchange rate on production, water quality, effluent characteristics and nitrogen budgets of intensive shrimp ponds. *Journal of the World Aquaculture Society* 24, 304-320.
- Imlay, M.J. & M.L. Paige. 1972. Laboratory growth of freshwater sponges, unionid mussels and sphaeriid clams. *Progressive Fish-Culturist* 34:210-216.
- Jones, A. 1999. Environmental management of aquaculture effluent: development of biological indicators and biological filters. PhD Thesis. University of Queensland, Australia. 238p.
- Kryger, J. & H.U. Riisgard. 1988. Filtration rate capacities in 6 species of European freshwater bivalves. *Oecologia* 77: 34-38.

- Kwei, C., P. Ruamthaveesub y P. Wanuchsoontorn. 1993. Integrated culture of the green mussel (*Perna viridis*) in wastewater from an intensive shrimp pond and practice. *World Aquaculture* 24(2): 68-73.
- Lara, G. 1988. Ordenamiento espacial y abundancia de *Diplodonchilensis* (Gray, 1828) (Bivalvia: Hyriidae) en el Lago Panguipulli. Valdivia. Chile. Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias con mención Ecología. Universidad Austral de Chile. Valdivia. 83 pp.
- Lara, G. & E. Parada. 1988. Distribución espacial y densidad de *Diplodonchilensis* (Gray, 1828) (Mollusca: Bivalvia) en el Lago Villarrica. *Bol. Soc. de Biol. de Concepción*. 58: 105 - 114.
- Lara, G., E. Parada., S. Peredo., J. Inostroza & H. Mora. 1988. La almeja de agua dulce *Diplodonchilensis* (Gray, 1828), un recurso potencial. *Bol. Mus. Reg. Araucanía (Temuco)* 3:33-40.
- Lin C, Ruamthaveesub P, Wanuchsoontorn P. Integrated culture of the green mussel *Pernaviridis* in wastewater from an intensive shrimp pond: concept and practice. *World Aquaculture* 1993; 24: 68-73.

- Mesina, E. 2009. Modelo parabiorremediación de efluentes camaronícolas en Nayarit, utilizando bivalvos natives. Tesis de Doctorado, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), Ensenada, México, 115PP.
- Miranda B.A. (2005) Remoción de materia particulada en efluentes de estanquería de camarón con *Anadara tuberculosa* (Pelecypoda: arcidae) (Sowerby, 1833). Tesis de Doctorado, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), Ensenada, México, 124pp.
- Muñoz, J. C. 2002. Tasa de filtración a diferentes salinidades y temperaturas del molusco bivalvo *Polymesoda solida* (Philippi, 1846) presente en el lago de Maracaibo. Trabajo Especial de Grado. La Universidad del Zulia. Facultad Experimental de Ciencias. Dpto. de Biología. Maracaibo.
- Newell, R. 1965. The role of detritus in the nutrition of two marine deposit feeders, the prosobranch *Hydrobia ulvae* and the bivalve *Macoma balthica*. Proc.Zool.Soc.Lond. 114(1): 25-45.
- Parada, E. 1987. Estrategias del ciclo vital de *Diplodonchilensis chilensis* (Gray, 1828) (Bivalvia: Hyriidae). Tesis

para optar al grado de Magister en Ciencias mención Zoología.
Universidad Austral de Chile. Valdivia. 175 pp.

Parada, E. & S. Peredo. Estado actual de la taxonomía y sistemática de bivalvos dulceacuícolas chilenos. Progresos y conflictos. Revista Chilena de Historia Natural (en prensa).

Pedrero, S. 2001. Detección y caracterización de virus patógenos humanos en muestras animales y moluscos bivalvos. Tesis Doctoral en Biología. Universidad de Barcelona, Dpto. de microbiología, Facultad de biología. Barcelona, España. pp.: 10-15.


Ramos, R., I. Vinatea, & R. Da Costa. 2008. Tratamiento de efluentes del cultivo de *Litopenaeus vannamei* por sedimentación y filtración por la ostra *Crassostrea rhizophorae*. Lat. Am. J. Aquat. Res., 36(2): 235-244.

Sepúlveda, A.1988. Estudio preliminar de la contaminación fecal de las aguas naturales utilizando un organismo bioindicador y la técnica de filtración de membrana. Seminario para optar al título de Tecnólogo Médico. Universidad Austral de Chile. Valdivia. 50pp.

- Soto D, Mena G. Filter feeding by the freshwater mussel, *Diplodon chilensis*, as a biocontrol of salmon farming eutrophication. *Aquaculture* 1999; 171: 65-81.
- Tenore, K. R. y W. M. Dustan. 1973. Comparison of rates feeding and biodeposition of the American oyster, *Crassostrea virginica* Cmlin, fed different species of phytoplankton. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 12: 19-26.
- Valdovinos, C. & R. Cuevas. 1996. Tasas de aclarancia de *Diplodonchilensis* (Bivalvia, Hyriidae): un suspensívoro bentónico dulceacuícola de Chile Central. *Medio Ambiente* 13(1): 114-11.
- Vallejos, P & M. Delucchi. 2001. Tratamiento de aguas servidas utilizando *Diplodonchilensis* (Gray, 1828) (Bivalvia, Hyriidae). *Sustentabilidad de la biodiversidad, un problema actual*. K. Alveal&T.Antezana. Eds. Universidad de Concepción. 785 - 795.
- Viozzi, G.P. & N.I. Brugni 2001. Relación parasitaria y nuevos registros de gloquidios de *Diplodon chilensis* (Unionacea: Hyriidae) en peces de la Patagonia argentina. *Neotropica* 47: 3-12
- Wang, J. 1990. Managing shrimp pond water to reduce problems. *Aquac. Eng.*, 9: 61-71.

ANEXO

Anexo 1. Ficha: Procedimiento de análisis para numeración de coliformes

	PROCEDIMIENTO DE ANALISIS PARA LA NUMERACIÓN DE COLIFORMES	Código: LSA P5.4-ML08 Página: 7 de 9 Fecha: 25/08/2008 Revisión: 02
---	---	--

ANEXO 3: Tabla NMP por 3 x 1 g (mL), 3 x 0,1 g (mL) y 3 x 0,01 g (mL)

Resultados de Número de Tubos Positivos			NMP	Resultados de Tubos Positivos			NMP
0	0	0	<0,30	2	2	0	2,1
0	0	1	0,30	2	2	1	2,8
0	1	0	0,30	2	2	2	3,5
0	1	1	0,61	2	3	0	2,9
0	2	0	0,62	2	3	1	3,6
0	3	0	0,94	3	0	0	2,3
1	0	0	0,36	3	0	1	3,8
1	0	1	0,72	3	0	2	6,4
1	0	2	1,1	3	1	0	4,3
1	1	0	0,74	3	1	1	7,5
1	1	1	1,1	3	1	2	12
1	2	0	1,1	3	1	3	16
1	2	1	1,5	3	2	0	9,3
1	3	0	1,6	3	2	1	15
2	0	0	0,92	3	2	2	21
2	0	1	1,4	3	2	3	29
2	0	2	2,0	3	3	0	24
2	1	0	1,5	3	3	1	46
2	1	1	2,0	3	3	2	110
2	1	2	2,7	3	3	3	>110

Fuente: ISO 7218: 1996, pág. 40

Anexo 2. Fotos de colecta de almejas en estanques en el Km 45 carretera
Yurimaguas-Tarapoto



Foto 1: Estanques del km 45



Foto 2: Toma de muestra



Foto 3: Toma de muestra



Foto 4: total de muestra tomada

Anexo 3: Distribución de las almejas en los acuarios para experimentación





Foto 7 y 8: Almejas en tratamiento experimental

Anexos 4. Fotos de control y seguimiento



Foto 9: Lectura



Foto10: Tratamientos



Foto 11: Toma de muestra de agua



Foto 12: Lectura de la muestra

Anexo 5. Fotos prueba de laboratorio. Método: filtración por membrana



Foto 13 y 14: dilución de la muestra de agua



Foto 15 y 16: Filtrado de la muestra de agua



Foto 17 y 18: Proceso de filtrado de la muestra de agua para análisis



Fotos 19 y 20: Proceso de siembra en placa



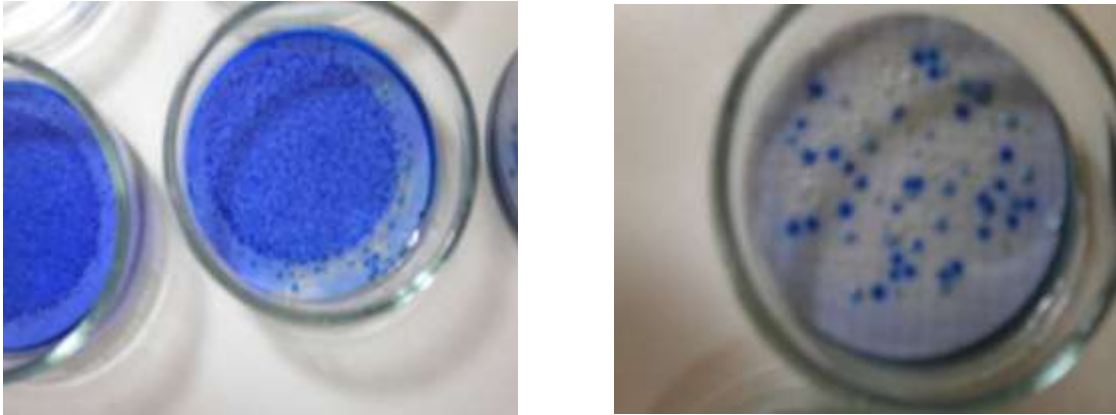
Fotos 21 y 22: Incubación de las muestras sembradas

Anexo 6. Fotos de los resultados obtenidos a las 24 horas



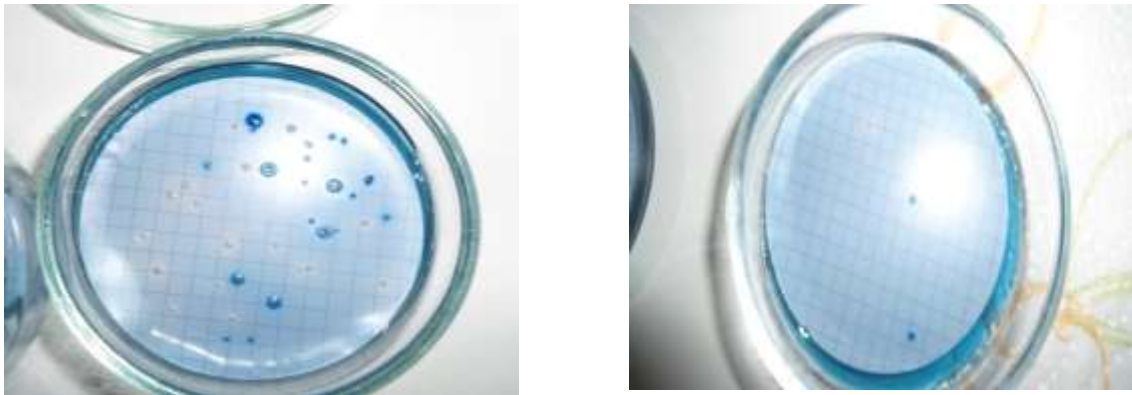
Fotos 23 y 24: Se observa gran crecimiento bacteriano (coliformes)

Anexo 7. Fotos de los resultados obtenidos a las 48 horas

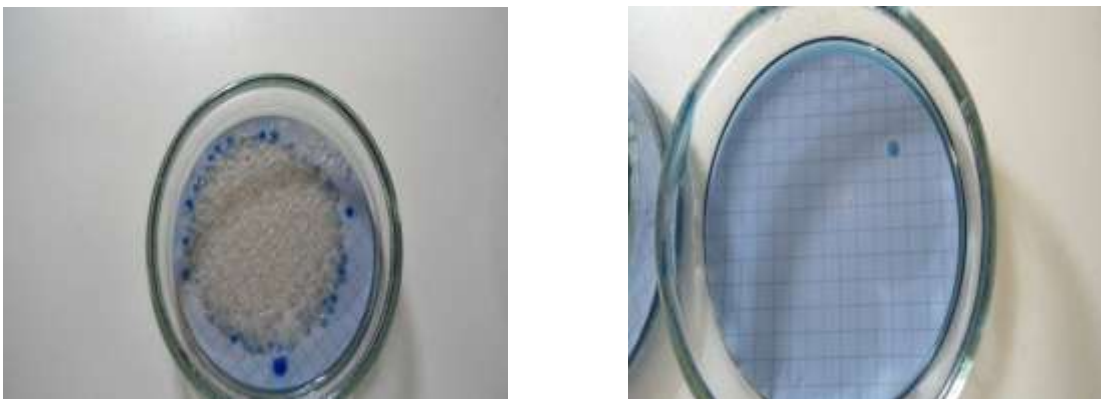


Fotos 25 y 26: Se observa la disminución de la carga bacteriana

Anexo 8. Fotos de los resultados obtenidos a las 72 horas



Fotos 27 y 28: Poco crecimiento bacteriano (coliformes)



Fotos 29 y 30: Crecimiento bacteriano en las placas sembradas

Anexo 9. Fotos de la toma de muestra visceral



Fotos 31 y 32: Muestreo de las almejas para análisis visceral



Fotos 33 y 34: toma y envaso de la muestra visceral

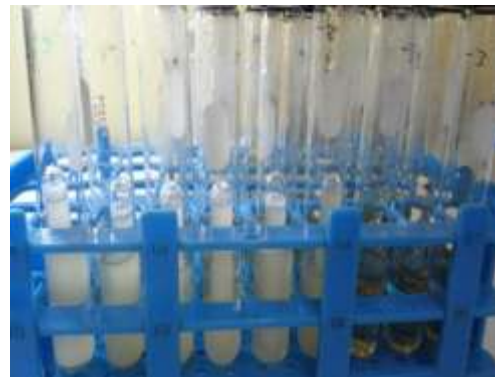
Anexo 10. Fotos de la prueba de laboratorio. Método por tubos múltiples



Fotos 35 y 36: Preparación para la siembra en tubos



Fotos 37 y 38: Preparación para incubación de las muestras sembradas



Fotos 39 y 40: Incubación de las muestras sembradas



Fotos 41 y 42: Lectura de las muestras incubadas



Fotos 43 y 44: Preparación del cultivo



Fotos 45 y 46: Filtrado de la muestra



Fotos 47 y 48: Dispensado de la muestra en baldes con agua



Fotos 49 y 50: Vaceado de la muestra de agua en los acuarios experimentales

Anexo 11. Fotos de la toma de muestra de agua para análisis bacteriológico



Fotos 51 y 52: Toma de muestra de los estanques del km 45

Anexo 12. fotos de medida de los parámetros fisicoquímicos de las muestras

