



UNAP



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

TESIS

**INFECCIÓN EXPERIMENTAL Y DETERMINACIÓN DE LA DL50-96H EN
Colossoma macropomum (CUVIER, 1818) CON *Aeromonas* sp.
PROVENIENTE DE BROTES EN PECES ORNAMENTALES**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGO**

PRESENTADO POR:

GINO ANDRES RENGIFO MARIN

ASESORES:

Blgo. FREDDY ORLANDO ESPINOZA CAMPOS, Dr.

M.V. JEFFERSON YUNIS AGUINAGA, Dr.

IQUITOS, PERÚ

2024

ACTA DE SUSTENTACIÓN



UNAP

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS N° 013-CGT-UNAP-2024

En la ciudad de Iquitos, Departamento de Loreto, mediante sala presencial, a los 13 días del mes de junio del 2024, a las 10:00 horas se dio inicio a la sustentación pública de la tesis titulada: "INFECCIÓN EXPERIMENTAL Y DETERMINACIÓN DE LA DL50-96H EN *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1818) CON *Aeromonas* sp. PROVENIENTE DE BROTES EN PECES ORNAMENTALES", presentado por el bachiller GINO ANDRES RENGIFO MARIN, autorizada mediante RESOLUCIÓN DECANAL N°291-2024-FCB-UNAP, para optar el Título Profesional de BIÓLOGO, que otorga la UNAP de acuerdo a Ley 30220, su Estatuto y el Reglamento de Grados y Títulos vigente.

El Jurado Calificador y Dictaminador designado mediante RESOLUCIÓN DECANAL N°276-2023-FCB-UNAP, de fecha 07 de diciembre de 2022, integrado por los siguientes Profesionales:

- | | |
|--|--------------|
| - Blga. EMER GLORIA PIZANGO PAIMA, M.Sc. | - Presidente |
| - Blgo. LUIS EXEQUIEL CAMPOS BACA, Dr. | - Miembro |
| - Blgo. ENRIQUE RÍOS ISERN, Dr. | - Miembro |



Luego de haber escuchado con atención y formulado las preguntas, las cuales fueron absueltas SATISFACTORIAMENTE



El Jurado después de las deliberaciones correspondientes, llegó a las siguientes conclusiones:

La sustentación pública y la Tesis han sido APROBADAS con la calificación de BUENA estando el Bachiller apto para obtener el Título Profesional de BIÓLOGO.

Siendo las 11:15 horas se dio por terminado el acto de sustentación.

Blga. EMER GLORIA PIZANGO PAIMA, M.Sc.
Presidente

Blgo. LUIS EXEQUIEL CAMPOS BACA, Dr.
Miembro

Blgo. ENRIQUE RÍOS ISERN, Dr.
Miembro

Blgo. FREDDY ORLANDO ESPINOZA CAMPOS, Dr.
Asesor

M.V. JEFFERSON YUNIS AGUINAGA, Dr.
Asesor

JURADO CALIFICADOR Y DICTAMINADOR



BLGA. EMER GLORIA PIZANGO PAIMA M.SC.

Presidente



BLGO. LUIS EXEQUIEL CAMPOS BACA, DR.

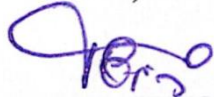
Miembro



BLGO, ENRIQUE RÍOS ISERN, DR.

Miembro

ASESORES

A handwritten signature in purple ink, appearing to read 'F. Espinoza'.

BLGO. FREDDY ORLANDO ESPINOZA CAMPOS, DR.

A handwritten signature in purple ink, appearing to read 'M.V. Jefferson Yunis Aguinaga'.

M.V. JEFFERSON YUNIS AGUINAGA, DR.

RESULTADO DEL INFORME DE SIMILITUD

Reporte de similitud

NOMBRE DEL TRABAJO

FCB_TESIS_RENGIFO MARIN.pdf

AUTOR

GINO ANDRES RENGIFO MARIN

RECUENTO DE PALABRAS

7400 Words

RECUENTO DE CARACTERES

39525 Characters

RECUENTO DE PÁGINAS

35 Pages

TAMAÑO DEL ARCHIVO

931.3KB

FECHA DE ENTREGA

Jul 4, 2024 12:19 AM GMT-5

FECHA DEL INFORME

Jul 4, 2024 12:20 AM GMT-5

● 20% de similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para cada base de datos.

- 18% Base de datos de Internet
- Base de datos de Crossref
- 9% Base de datos de trabajos entregados
- 5% Base de datos de publicaciones
- Base de datos de contenido publicado de Crossref

● Excluir del Reporte de Similitud

- Material bibliográfico
- Coincidencia baja (menos de 10 palabras)

Resumen

DEDICATORIA

A Dios por guiarme siempre en mi caminar,
dándome mucha fortaleza para enfrentar
cualquier adversidad que se me presente,
dándome la sabiduría necesaria para
afrontarlos.

A mis padres María Eldi Marín Arévalo y
Andres Rengifo Flores que han sido la
base de mi formación, cada uno de
ustedes han aportado grandes cosas a
mí vida personal y profesional, y me han
ayudado a enfrentar la gran tarea de
encarar a la sociedad. Les agradezco
por todo, en especial por ser los
principales benefactores del desarrollo
de mi tesis.

Amigos y compañeros que siempre
confiaron en mí, brindándome su
muestra de cariño y confianza en los
buenos y malos momentos que pase
durante el desarrollo del trabajo de
investigación.

Gino Rengifo

AGRADECIMIENTO

A la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana (UNAP) por ser el ente gestor en mi desarrollo como profesional.

Al Blgo. Germán Augusto Murrieta Morey Dr., responsable de la Dirección de Ecosistemas Acuáticos Amazónicos (AQUAREC) e investigador principal del Laboratorio de Parasitología y Sanidad Acuícola por la confianza hacia mi persona, el apoyo incondicional, las facilidades, el lugar y el respaldo científico para la ejecución de la presente investigación.

A mi asesor Blgo. Freddy Orlando Espinoza Campos Dr., docente de la Facultad de Ciencias Biológicas – UNAP, por su asesoramiento generoso y el apoyo en la elaboración, interpretación y corrección de los datos de la tesis.

Al M.V. Jefferson Yunis Aguinaga Dr., Por la invitación y confianza de hacer tesis en el en el proyecto FONDECYT, Por su asesoramiento desinteresado y apoyo motivacional para la corrección del plan de Tesis, también quiero agradecer al Blgo. Luis García Ruiz, M.Sc., por su asesoramiento, por las correcciones minuciosas que brindó en el plan de tesis y sus intervenciones espléndidas con las muestras de estudio.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Págs
PORTADA.....	i
ACTA DE SUSTENTACIÓN.....	ii
JURADO CALIFICADOR Y DICTAMINADOR.....	iii
ASESORES.....	iv
RESULTADO DEL INFORME DE SIMILITUD.....	v
DEDICATORIA.....	vi
AGRADECIMIENTO.....	vii
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xii
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO.....	4
1.1. Antecedentes.....	4
1.2. Bases teóricas.....	6
1.3. Definición de términos básicos.....	11
CAPÍTULO II. HIPÓTESIS Y VARIABLES.....	15
2.1. FORMULACIÓN DE LA HIPÓTESIS.....	15
2.2. VARIABLE Y SU OPERACIONALIZACIÓN.....	15
CAPÍTULO III. METODOLOGÍA.....	16
3.1. Diseño metodológico.....	16
3.2. Diseño muestral.....	16
3.2.1. Población de estudio.....	16
3.2.2. Tamaño de la muestra de estudio.....	16
3.2.3. Obtención de la muestra.....	17
3.2.4. Muestreo o selección de la muestra.....	17
3.3. Criterios de selección.....	18

3.4. Procedimientos, técnicas e instrumentos de recolección de datos	18
3.5. Análisis de datos.....	21
3.6. Aspectos éticos.....	21
CAPITULO IV. RESULTADOS.....	22
4.1. Evaluación macroscópica de las lesiones de los principales órganos afectados por <i>Aeromonas sp.</i>	22
4.2. Identificación de las <i>Aeromonas sp.</i>	25
4.3. Hallazgos histológicos producidas por la bacteria <i>Aeromonas sp.</i> , inoculadas en distinta dosis en <i>Colossoma macropomum</i> “Gamitana.....	26
4.4. Determinación de la DL50 de <i>Aeromonas sp.</i> , en <i>Colossoma macropomum</i>	27
CAPÍTULO V. DISCUSIÓN	29
CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES	32
CAPÍTULO VII. RECOMENDACIONES	33
CAPÍTULO VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	34
ANEXOS	39

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Caracterización bioquímica del aislado 14 (<i>Trachelyopterus galeatus</i>), aislado 17(<i>Astyanax</i> sp) y ATCC 35654.	25
Tabla 2. Efectos clínicos de acuerdo a las concentraciones de la DL50 de <i>Aeromonas</i> sp. En <i>Colossoma macropomum</i> a los días de evaluación	27

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. A. <i>Trachelyopterus galeatus</i> con hemorragias, natación errática y distensión abdominal y <i>Astyanax</i> sp con hemorragias B.	21
Figura 2. Deshilachamiento de la aleta anal y caudal en ambos ejemplares de <i>Colossoma macropomum</i> , acompañado de úlceras focales y multifocales.	22
Figura 3. Úlceras en la región dorsal, ventral y caudal de ejemplar de <i>Colossoma macropomum</i> ocasionado por la bacteria <i>Aeromonas</i> sp.	23
Figura 4. Hemorragia en la aleta pectoral de <i>Colossoma macropomum</i>	23
Figura 5. Hemorragia interna, hepatomegalia (A), opacidad de la córnea (B).	24
Figura 6. Colonias aisladas de la bacteria <i>Aeromonas</i> sp.	25
Figura 7. A. Hallazgos histopatológicos en <i>Colossoma macropomum</i> . Necrosis de la Degeneración renal e hidrópica. Tinción con hematoxilina y eosina y B. Hallazgos histopatológicos en <i>Colossoma macropomum</i> . Hemorragia necrosis en el hígado. Tinción con hematoxilina	26
Figura 8. Supervivencia de <i>Colossoma macropomum</i> experimentalmente infectado con <i>Aeromonas veronii</i> aislada de <i>Trachelyopterus galeatus</i> (A) y con <i>Aeromonas hydrophila</i> aislada de <i>Astyanax</i> sp (B).	28

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Recolección de peces ornamentales enfermos en los acuarios.	39
Anexo 2. Colecta de los ejemplares de <i>Colossoma macropomum</i> y lugar acondicionamiento de los mismos.	39
Anexo 3. Aislamiento e identificación de <i>Aeromonas</i> sp.	40
Anexo 4. Infección experimental a <i>Colossoma macropomum</i> por <i>Aeromonas</i> Sp.	41
Anexo 5. Análisis de <i>Colossoma macropomum</i> infestados con <i>Aeromonas</i> sp.	42

RESUMEN

El comercio mundial de peces ornamentales conlleva importantes factores de riesgo para la propagación de patógenos a nivel mundial, no solo para los peces ornamentales, sino también para los peces de cultivo. En este trabajo, se reportó la capacidad de *Aeromonas veronii* y *Aeromonas hydrophila* aisladas de peces ornamentales para infectar experimentalmente a *Colossoma macropomum*, además se realizó la caracterización primaria de las mismas. Para la determinación de la DL50, los peces se inocularon con 0,1 mL de concentraciones crecientes de *A. hydrophila* o *A. veronii* correspondientes a los tubos 5 a 9 de los estándares de McFarland (C1 = 1×10^2 ; C2 = $1,8 \times 10^4$; C3 = $2,1 \times 10^6$; C4 = $2,4 \times 10^8$ células bacterianas por ml) en la cavidad celómica. En el grupo de control, los peces recibieron el mismo volumen de solución salina estéril (0,65%). Los peces presentaron petequias, sufusiones en la piel y altas tasas de mortalidad de hasta el 100%. Histopatológicamente, los peces presentaron necrosis con cariólisis, pérdida de la delimitación citoplasmática de las células de los túbulos renales, hemorragia y presencia de colonias bacterianas. La LD50-96h de *A. veronii* en *C. macropomum* se estimó en 24×10^6 CFU mL⁻¹, con sus límites inferior y superior en $0,7965 \times 10^6$ y $73,38 \times 10^6$ CFU mL⁻¹, mientras que para *A. hydrophila* se estimó en $1,408 \times 10^5$ CFU mL⁻¹ y con sus límites inferior y superior en $0,4905 \times 10^5$ y $4,041 \times 10^5$ CFU mL⁻¹, respectivamente. Los resultados demostraron que las especies de *Aeromonas* aisladas de peces ornamentales afectan a *C. macropomum* causando signos clínicos y lesiones similares. Esto demuestra la importancia de promover medidas de control de riesgos en el comercio de peces ornamentales para evitar pérdidas económicas.

Palabras clave: Amazonia Peruana, bacteria, dosis letal, histología, infección

ABSTRACT

The global trade in ornamental fish carries significant risk factors for the spread of pathogens globally, not only for ornamental fish, but also for farmed fish. In this work, we report the ability of *Aeromonas veronii* and *Aeromonas hydrophila* isolated from ornamental fish to experimentally infect *Colossoma macropomum*, and their primary characterization was also carried out. For the determination of the LD50, fish were inoculated with 0.1 mL of increasing concentrations of *A. hydrophila* or *A. veronii* corresponding to tubes 5 to 9 of the McFarland standards (C1 = 1×10^2 ; C2 = 1.8×10^4 ; C3 = 2.1×10^6 ; C4 = 2.4×10^8 bacterial cells per ml) in the coelomic cavity. In the control group, fish received the same volume of sterile saline solution (0.65%). The fish presented petechiae, suffusions on the skin and high mortality rates of up to 100%. Histopathologically, the fish presented necrosis with karyolysis, loss of cytoplasmic delimitation of the cells of the renal tubules, hemorrhage and the presence of bacterial colonies. The LD50-96h of *A. veronii* in *C. macropomum* was estimated at 24×10^6 CFU mL⁻¹, with its lower and upper limits at 0.7965×10^6 and 73.38×10^6 CFU mL⁻¹, while for *A. hydrophila* was estimated at 1.408×10^5 CFU mL⁻¹ and with its lower and upper limits at 0.4905×10^5 and 4.041×10^5 CFU mL⁻¹, respectively. The results demonstrated that *Aeromonas* species isolated from ornamental fish affect *C. macropomum* causing similar clinical signs and lesions. This demonstrates the importance of promoting risk control measures in the ornamental fish trade to prevent the spread of diseases and economic losses.

Keywords: Peruvian Amazon, bacteria, lethal dose, histology, infection

INTRODUCCIÓN

Los elementos de agua dulce de la Amazonía peruana son una fuente inestimable de riqueza en distintos espacios, como la economía, artes, ciencia y educación. En los ecosistemas acuáticos de la Amazonia vive una extensa variedad de organismos, desde invertebrados hasta mamíferos, pero por el número de especies y su abundancia, los peces conforman una categoría fundamentalmente importante ⁽¹⁾.

Gracias a la extensa variedad, cantidad, belleza y prominente valor de estas especies en el mercado mundial, el comercio de peces ornamentales amazónicos es un negocio muy variado. La exportación y el comercio de peces ornamentales se considera una actividad social y económica de enorme consideración para la Región Loreto, de la cual depende una cantidad considerable de pobladores loretanos, puesto que dio lugar a una industria lucrativa que actualmente obtiene considerables ingresos ^(2,3).

Los recursos hidrobiológicos, incluidos los peces ornamentales, son susceptibles a una serie de patologías ocasionadas por hongos, protozoos, trematodos, nematodos, cestodos, crustáceos y bacterias. Todas estas patologías tienen la posibilidad de ocasionar la muerte del pez. Los perjuicios ocasionados por estas patologías repercuten de manera directa en la reducción del valor de mercado del pez ^(4,5).

Estas sólo se expresan cuando se dan las condiciones adecuadas, como en la situación de la reducción de la calidad del agua o la debilidad de los peces ocasionado por estar en cautiverio, es ahí en donde se generan ocasiones de estrés que tienen la posibilidad de apariciones de enfermedades por bacterias,

virus y hongos. Un caso de muestra de esto es *Aeromonas* sp, una bacteria Gram negativa que puede perjudicar a los peces ornamentales y de consumo, de las cuales se puede controlar o erradicar la enfermedad con terapia con antibióticos ⁽⁶⁾.

Entre los trastornos infecciosos, *Aeromonas* sp., produce una septicemia hemorrágica bacteriana, que se destaca por lesiones en la piel de los peces con apariencia de úlceras focales y multifocales. Además, puede perjudicar a la epidermis, los músculos y los órganos internos del pez. ⁽⁷⁾. Esta bacteria se ha relacionado con *Colossoma macropomum* (gamitana) y *Piaractus mesopotamicus* (pacú blanco) ^(8,9).

Se estima que uno de los agentes etiológicos más destacables de las patologías bacterianas de los peces, es *Aeromonas* sp. ⁽¹⁰⁾. La existencia de estas bacterias oportunistas no en todos los casos es un signo de patología porque se suelen encontrar en el microbiota intestinal de los peces y otras especies acuáticas lo que lo hace patógenas es la condición en la que se encuentre el pez. La patogénesis multifactorial de la patología por *Aeromonas* sp., puede ser el resultado de una diversidad de genes diferentes que trabajan tanto individual como colectivamente ⁽¹¹⁾.

Al no haber un tratamiento adecuado para esta bacteria, y no saber los signos clínicos que estas causan a los peces ornamentales y de consumo; el presente estudio busca mostrar las manifestaciones clínicas externas e internas de la bacteria en el pez.

Para lo cual el presente trabajo de tesis tuvo como objetivo general describir la infección experimental en *Colossoma macropomum* con *Aeromonas* sp., proveniente de brotes en peces ornamentales y determinación de la DL50-96h, como objetivos específicos: a) Evaluar macroscópicamente las lesiones de los principales órganos afectados por *Aeromonas* sp, b) Identificar cepas de *Aeromonas* sp, c) Describir los hallazgos histológicos producidos por la bacteria *Aeromonas* sp., inoculadas en distinta dosis en *Colossoma macropomum* "Gamitana y d) Determinar la DL50 de *Aeromonas* sp., en *Colossoma macropomum*.

CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes

El tetra neón (*Paracheirodon innesi*), un pez amazónico ornamental, fue analizado por medio de procedimientos microbiológicos e histológicos en una investigación que se publicó en 2015, donde se recogieron 168 peces en total de manera aleatoria. Además, se recogieron muestras del riñón y del bazo a lo largo de la necropsia de 84 peces para aislar bacterias en agar de soja tripticasa (TSA), Citophaga (AO) y Middlebrook 7H9. Estas bacterias se identificaron por medio de tinción de Gram y examen bioquímico como correspondientes a los géneros *Flavobacterium*, *Staphylococcus*, *Carnobacterium*, *Pseudomonas*, *Enterococcus* y *Bacillus*. Al tener lesiones en el intestino, las branquias, el hígado, el riñón y los músculos, la exploración halló que el parásito *Microsporidium* sp. Era el responsable de la mayor parte de las lesiones, y además identificó los géneros *Pleistophora* sp. y *Heterosporis* sp⁽¹²⁾.

En un estudio realizado en tilapias nilóticas (*Oreochromis niloticus*) se utilizó una dosis bacteriana semejante a la dosis mortal de 50 en 96 horas para ese aislado de *A. hydrophila* publicado en 2017. Se evaluaron los indicios clínicos presentados por todos los peces en las necropsias llevadas a cabo a las 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 y 180 horas luego de la infección. Se determinó que la mayor parte de los indicios clínicos se hacían visibles 48 horas luego de la infección. Predomina la aparición de indicios inespecíficos en los animales infectados experimentalmente, como anorexia, letargo y cambios de color. Los hallazgos más típicos de la necropsia son hígados y bazos congestivos y friables, de esta forma como gases y contenido gastrointestinal sanguinolento.

Se pudo producir un cuadro patológico habitual de septicemia por *Aeromonas* móviles por medio de la infección en fase de prueba intraperitoneal de tilapias (*Oreochromis niloticus*) ⁽¹³⁾.

En otro estudio, se utilizaron 33 aislados de *Aeromonas* sp. Procedentes de diferentes especies de peces de agua dulce con signos clínicos en el 2019, se llevó a cabo una exploración cuantitativa, retrospectiva, transversal y de interfaz en fase de prueba (6% *A. allosaccharophila*, 6% *A. bestiarium*, 3% *A. caviae*, 15% *A. punctata*, 36% *A. hydrophila* y 33% *A. veronii*). El estudio halló que una sección sustancial (82,3%) de los aislados era multirresistente a los antimicrobianos, pero además llegó a la conclusión de que todos los aislados estudiados eran susceptibles a los efectos de la enrofloxacin y la nitrofurantoína ⁽¹⁴⁾.

En el 2019, se llevó a cabo un estudio cuantitativo que utilizó como población peces de acuarios de Iquitos y Lima y que empleó un diseño en fase de prueba y transversal retrospectivo. De acuerdo con el estudio, la dosis media mortal de sulfato de cobre para diez especies de peces continentales osciló entre 0,16 y 1. 6 mg/L: Neón tetra (*Paracheirodon Innesi*), dorado (*Carassius auratus*), guppy (*Poecilia reticulata*), bagre ventosa (*Otocinclus macrospilus*), barbo (*Barbus tetrazona*), molly (*Poecilia sphenops*) monjita (*Gymnocorymbus ternetzi*), espada (*Xiphophorus helleri*), platy (*Xiphophorus maculatus*) y Corydora (*Corydora aeneus*) y el trabajo llegó a la conclusión que las CL50 fueron equitativamente de: 0,8mg/L,24h; 1,2mg/L,96h; 0,4mg/L,96h; 1,2mg/L,48h; 0,8mg/L,48h; 0,16mg/L,24h; 0,8mg/L,24h; 0,1652mg/L,24h; 1,6mg/L,24h y 0,6mg/L,96h ⁽¹⁵⁾.

1.2. Bases teóricas

Descripción taxonómica

Reino: Animalia

Filo: Chordata

Clase: Actinopterygii

Orden: Characiformes

Familia: Serrasalminidae

Género: *Colossoma*

Colossoma macropomum Cuvier,

1816

Descripción de *Colosomma macropomum*.

La gamitana es un pez de la familia Serrasalminidae. Su nombre científico es *Colossoma macropomum*, y se estima que es el más grande carácido del Amazonas ⁽¹⁶⁾; tiene un cuerpo prominente, forma romboidal, dos filas de dientes molariformes enormes, es omnívoro con inclinación a los vegetales, filtra plancton para complementar su dieta, una aleta anal radiada que la fija ⁽¹⁷⁾.

Esta especie desova más de un millón de ovocitos. El volumen y el peso comercial de esta especie oscilan entre 25 y 30 cm y entre 1 y 5 kg, respectivamente, y puede lograr una longitud de 1 m y un peso de 30 kg en medio natural. Con una longitud habitual de 55 cm, madura sexualmente a los 4 años y entra en la etapa juvenil entre 3 y 5 cm de LT ⁽¹⁸⁾.

Consideraciones generales de la investigación

La acuicultura se encuentra dentro de las alineaciones rentables y con más gran potencial ⁽¹⁹⁾. La acuicultura y la exportación de peces ornamentales son

dos de las industrias que más crecen. Esto se da por la disponibilidad de agua y otras masas de agua en la Amazonia peruana, de esta forma como a su riqueza en especies nativas prometedoras. La gamitana se encuentra dentro de las especies más importantes para su cultivo ⁽²⁰⁾.

Las cuestiones sanitarias que existen, más las razones del ámbito; químico, físicas y biológicas agregar dentro de estos, los patógenos, tales como; parásitos, virus y bacterias por ejemplo anomalías de la salud que causan inconveniente a los peces y esto a los otros, de esta forma *Colossoma macropomum* (gamitana) muestra diversos tipos de anomalías de la salud como la bacteria *Flexibacter columnaris*, la patología de la mancha blanca del parásito *Ichthyophthirius multifiliis*, y entre estas la septicemia hemorrágica bacteriana ocasionada por *Aeromonas hydrophila* causante de muchas pérdidas económicas ⁽⁹⁾. Entonces, la cepa de instrumentos inmunosupresores preventivos (vacunas) es para bajar el choque de las anomalías de la salud en las distintas funciones acuícolas, se encuentra dentro de las causas que limitan la producción, la venta y la exportación de peces de la acuicultura ⁽²¹⁾. A esto le sigue la consideración de usar la "dosis media mortal 50" en los proyectos de exploración y desarrollar un prebiótico para el tratamiento o la cura.

Bacterias del género *Aeromonas* sp.

Todas las especies del género, a distinción de *Aeromonas salmonicida* y *Aeromonas media*, son móviles gracias a los flagelos polares. El género se destaca por tener microorganismos que son bacilos. Tienen la posibilidad de crecer en un medio que tenga dentro 3% de NaCl y son gramnegativos,

oxidasa y catalasa positivos, capaces de descomponer nitratos y nitritos, fermentadores de glucosa como primordial fuente de carbono y energía. Las exoenzimas producidas por los integrantes de este género tienen dentro proteasas, DNasas, RNasas, elastasas, lecitinasas, amilasas, gelatinasas y lipasas, por ejemplo. Se estima que muchas de estas exoenzimas son componentes de virulencia ⁽²²⁾.

En funcionalidad de la aptitud de movimiento de las especies y de la temperatura ideal de desarrollo, el género *Aeromonas* se clasifica en dos enormes grupos. El primer grupo, que tiene dentro a los mesófilos y móviles, es grande y genéticamente diverso. El segundo grupo, popular como grupo psicrófilo, es más reducido y genéticamente homogéneo. Está compuesto por solo una clase, *Aeromonas salmonicida*. *A. hydrophila*, *A. bestiarum*, *A. salmonicida*, *A. caviae*, *A. media*, *A. eucrenophila*, *A. sobria*, *A. veronii*, *A. jandaei*, *A. encheleia*, *A. schubertii*, *A. trota*, *A. allosaccharophila* y *A. popoffii* están entre las 14 especies del género ⁽²³⁾.

Descripción de *Aeromonas* sp. En organismos acuáticos (Peces).

Se estima que uno de los agentes etiológicos más destacables de las anomalías de los peces es *Aeromonas* sp. Ya que estas bacterias oportunistas están presentes de manera natural en el microbiota intestinal de los peces y otros animales acuáticos, las propiedades del ambiente y fisiológicas similares con el estrés tienen la posibilidad de provocar brotes de anomalías de la salud, lo que puede ocasionar destacables pérdidas económicas en la acuicultura ⁽²⁴⁾.

Las ulceraciones dérmicas, la podredumbre de las aletas y la cola, las ulceraciones oculares, la eritrodermatitis, la septicemia hemorrágica, la patología de las llagas rojas, la patología de la podredumbre roja y la patología de las escamas son algunas de las anomalías de la salud patológicas que se han relacionado con los integrantes de *Aeromonas* sp. Cuando la infección por *Aeromonas* está en su etapa aguda, puede realizarse una septicemia mortal de manera rápida que el pez puede fallecer antes de exhibir algún signo clínico.

Los peces damnificados tienen la posibilidad de enseñar exoftalmia, enrojecimiento de la piel, acumulación de líquido en la base de las escamas y distensión abdominal ⁽²⁵⁾. Además, los procesos de septicemia hemorrágica generados por *Aeromonas* sp son multifactoriales y perjudican a una extensa selección de especies, incluidos los peces comestibles y ornamentales.

La dispersión generalizada con apariencia de bacteriemia, la producción de toxinas, la necrosis tisular y una etapa clínica posterior son las propiedades de la septicemia hemorrágica. Las lesiones producidas van acompañadas de exoftalmia asociada a edema preorbital, hiperemia capilar, exudación, hemorragias petequiales focales y exoftalmia. *Aeromonas* sp y otras móviles. En los ecosistemas de agua dulce de todo el planeta, *Aeromonas* se encuentra dentro de las bacterias más prevalentes ⁽¹²⁾.

Los signos externos más evidentes de la infección en los peces damnificados tienen dentro petequias en la piel, palidez, letargo, jadeo en el área, rigidez más acuosa en los animales infectados, anorexia, debilidad, congestión, hemorragias, necrosis e hinchazón en los órganos internos, dermatitis

necrótico-ulcerosa, oscurecimiento del cuerpo, segregación en grupo y muerte. Las lesiones internas tienen dentro, por ejemplo, múltiples petequias en el área del hígado y el parénquima, branquias con marcada hiperplasia del epitelio laminar primario y grave hinchazón de células inflamatorias mononucleares, necrosis y degeneración vacuolar de las células epiteliales, formas blásticas de los glóbulos rojos, normoblastos y una destacable reducción del número de plaquetas. Una infección sistémica tiende a ser un síntoma de una más grande afectación bacteriana, que con continuidad hace la desaparición del pez ⁽²⁶⁾.

Donde quiera que se propague, *Aeromonas* sp infecta a los peces de agua templada y a los peces ornamentales por igual, ocasionando anomalías de la salud. La gravedad de las anomalías de la salud similares con *Aeromonas* es más grande en los peces criados en ámbitos de cultivo intensivo. Tanto la columna de agua como el sedimento tienen dentro la bacteria. En lugares donde habitan con una extensa selección de propiedades de conductividad, turbidez, pH, salinidad y temperatura, las *Aeromonas* sp han evolucionado para subsistir ⁽²⁷⁾.

Medidas de prevención y control

Las principales medidas de prevención en piscigranjas son la cuarentena de los peces antes de ingresar a la piscigranja, limpieza y desinfección de espacios y utensilios, capacitación en el manejo de peces al personal, uso de filtros en el ingreso del agua, uso de cal en estanques de tierra, adquisición de alevines de piscigranja certificadas, solo permitir el ingreso a la piscigranja previa desinfección. La principal medida de control de enfermedades

bacterianas es el uso de vacunas, sin embargo, aún no existen vacunas comerciales en peces amazónicos. Además, se puede hacer uso de inmunoestimulantes, fitoterápicos, probióticos y otros nutraceúticos, sin embargo, es necesario realizar estudios sobre la eficacia y dosis de los mismos en las condiciones que presente la piscigranja ⁽²⁵⁾.

1.3. Definición de términos básicos

Aeromonas: *Aeromonas* es un género de bacterias en forma de bacilo, gram negativa y anaerobia facultativa ⁽²⁸⁾.

Dosis letal media: dosis de una sustancia, radiación o patógeno necesaria para matar a la mitad de un conjunto de animales de prueba después de un tiempo determinado ⁽²⁸⁾.

Histopatología: estudio histológico de los tejidos enfermos. Fundamentalmente cuando se generan en proporciones muy enormes ⁽²⁸⁾.

Aerobios facultativos: tipo de bacteria más versátil: pueden vivir con o sin oxígeno ⁽²⁴⁾.

Branquiespinas: serie de proyecciones óseas como espinas fijadas a lo largo del borde anterior de los arcos branquiales de los peces ⁽²⁸⁾.

Catalasa positiva: es un método bioquímico rápido y fácil para la diferenciación de bacterias aerobias ⁽²⁷⁾.

Caudal: hacia el extremo inferior del cuerpo, en el extremo de la cola de los peces ⁽¹⁹⁾.

Craneal: cráneo, o la parte que encierra el cerebro de los peces ⁽¹⁹⁾.

Cultivo en circuito abierto: depósitos con o sin flujo continuo de agua; y sin sistema de depuración de aguas para su reutilización en el propio cultivo acuícola ⁽¹⁸⁾.

Dermis: conjunto de tejidos conjuntivos denso o fibroso; posee algunas capas de células de pigmento en la parte marginal entre la epidermis y la capa subcutánea (hipodermis), las cuales dan el color a los peces ⁽²⁸⁾.

Diseminarse: extender o esparcir sin orden y en diferentes direcciones ⁽¹⁷⁾.

Dorsal: Relativo a la espalda o a la región posterior del cuerpo de los peces ⁽¹⁾.

Erosiones cutáneas: parches de piel enrojecidos, con bultos posiblemente con ampollas o ronchas de los peces ⁽⁴⁾.

Epidermis: la capa más externa de las capas de la piel, se deriva del ectodermo embrionario de los peces ⁽⁴⁾.

Factores de virulencia: cualquier componente que sea esencial para el microorganismo causar enfermedades y desarrollar su capacidad de hacerlo ⁽⁷⁾.

Gastroenteritis: inflamación de las mucosas del estómago y del intestino que se da simultáneamente y es debida a una infección ⁽⁷⁾.

Hematíes: célula de color rojo de la sangre de los animales vertebrados que contiene hemoglobina y se encarga de transportar el oxígeno a todas las partes del cuerpo ⁽⁷⁾.

Hemorragias: salida de sangre de las arterias, venas o capilares por donde circula, especialmente cuando se produce en cantidades muy grandes ⁽²⁸⁾.

Letargia: Afección caracterizada por somnolencia y una falta poco común de energía y agilidad mental ⁽²⁸⁾.

Líquido ascítico: es un líquido seroso producido por el peritoneo en la cavidad abdominal que lubrica la superficie del tejido que recubre la pared abdominal y la cavidad pélvica de los peces ⁽²⁸⁾.

Mesófilas: se refiere a un organismo cuya temperatura de crecimiento óptima está entre los 20 y los 45 °C ⁽²⁸⁾.

Micosis: es un hongo que invade el tejido puede ocasionar una enfermedad que se limita a la piel o que se extienda al tejido, los huesos y los órganos, o que afecte a todo el cuerpo de los peces ⁽⁴⁾.

Microbiología: es la ciencia encargada del estudio y análisis de los microorganismos, seres vivos diminutos no visibles al ojo humano, también conocidos como microbios ⁽⁴⁾.

Microorganismo: es un ser vivo o un sistema biológico que solo puede visualizarse con el microscopio ⁽⁴⁾.

Morbilidad: es un estado enfermo, de discapacidad, o mala salud debido a cualquier causa ⁽⁴⁾.

Úlcera: llaga o lesión que aparece en la piel o en el tejido de las mucosas a causa de una pérdida de sustancia y que no tiende a la cicatrización ⁽²⁸⁾.

Ventral: vientre o lado inferior de los peces ⁽²⁸⁾.

Mortalidad: Cantidad de seres vivos que mueren en un lugar y en un período de tiempo determinados en relación con el total de la población (28).

Necropsia: es un procedimiento médico que emplea la disección, con el fin de obtener información privada anatómica sobre la causa, naturaleza, extensión y complicaciones de la enfermedad que sufrió el pez en vida (14).

Necrótico-ulcerativa: infección aguda con manifestaciones de dolor en las encías, necrosis en papilas interdentes, sangrado espontáneo y ataque al estado general (20).

Oxidasa: es una enzima que cataliza una reacción de oxidación/reducción empleando oxígeno molecular (25).

Patógeno: cualquier microorganismo capaz de producir alguna enfermedad o daño en un hospedero (25).

Psicrófilo: son aquellas bacterias cuya temperatura de crecimiento óptima es baja, aproximadamente 15°C o inferior (25).

CAPÍTULO II. HIPÓTESIS Y VARIABLES

2.1. FORMULACIÓN DE LA HIPÓTESIS

La *Aeromonas* sp., proveniente de brotes en peces ornamentales infectará a *Colossoma macropomum*.

2.2. VARIABLE Y SU OPERACIONALIZACIÓN

Variable	Definición	Tipo por su naturaleza	Indicadores	Escala de medición	Categorías	Valores de medición	Medición de verificación
V.D. Signos clínicos producidos por <i>Aeromonas</i> sp inoculadas en distinta dosis en <i>Colossoma macropomum</i> "Gamitana" de brotes de peces ornamentales.	Son manifestaciones objetivas, clínicamente fiables, observadas durante la exploración.	Cualitativa	Identificación y descripción de signos clínicos producidos.	Nominal	Pez sano		-Cuaderno de apuntes. -capturas -Hoja de cuadro de datos.
V.D. Hallazgos histológicos producidos por la bacteria <i>Aeromonas</i> sp inoculadas en distinta dosis en <i>Colossoma macropomum</i> "Gamitana"	Lesiones histológicas que se encuentran mediante un examen microscópico de tejido, para estudiar las manifestaciones de la enfermedad en los peces	Cualitativa	Identificación y descripción de hallazgos histológicos producidos.	Nominal Nominal	Pez sano Pez enfermo	Aletas Branquias Ojos Piel Coloración Aletas Año Inflamatorio: Células granulares	-Hojas de EXCEL
V.I. Dosis letal media de <i>Aeromonas</i> sp. en <i>Colossoma macropomum</i> "Gamitana"	Calculo estadístico, que mide a un agente químico o físico (radiación) que se espera que mate al 50% de los organismos de una población bajo un conjunto de condiciones definidas.	Cuantitativa	Cálculo de DL50 mediante el programa Trimmed-Spearman – Karber.	Ordinal	1% al 50%	Línea horizontal desde el 50% de mortalidad (en el eje de ordenadas) hasta la línea dosis-efecto.	

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA

3.1. Diseño metodológico

Debido a que la hipótesis establece una conexión causal, el diseño en fase de prueba de la presente investigación fue de carácter experimental, porque se caracterizó los distintos indicios y casos clínicos causados por brotes de *Aeromonas sp.* En *Colossoma macropomum* "Gamitana".

3.1.2. Lugar de ejecución

El lugar donde se ejecutó el estudio fue el Laboratorio de Parasitología y Sanidad Acuícola del Centro de Investigaciones "Fernando Alcántara Bocanegra" del Programa de Investigación en Ecosistemas Acuáticos Amazónicos – AQUAREC del Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana – IIAP. Ubicado al margen derecho del Km 4,5 de la Carretera Iquitos-Nauta, al sur oeste de la ciudad de Iquitos. Políticamente pertenece al Distrito de San Juan Bautista, Provincia de Maynas, Departamento de Loreto.

3.2. Diseño muestral

3.2.1. Población de estudio

Estuvo conformada por todos los individuos de *Colossoma macropomum* recogidos en los estanques piscícolas del Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana (IIAP).

3.2.2. Tamaño de la muestra de estudio

El tamaño de la muestra estuvo representado por 180 ejemplares de *Colossoma macropomum* "Gamitana" colectados en los estanques piscícolas del Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana - IIAP, Iquitos. Usando una variante de *Aeromonas sp.* Que fue aislada de un pez ornamental.

3.2.3. Obtención de la muestra

Los peces fueron adquiridos de los estanques de cultivo del Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana – IIAP con ayuda de los técnicos agropecuarios que laboran en la institución se procedió con la extracción de los ejemplares de *Colossoma macropomum* en horas de la mañana desde las 8:00 hasta las 10:00 am para evitar el estrés de los ejemplares que puede ocasionar la temperatura elevada de los rayos solares.

3.2.4. Muestreo o selección de la muestra

La selección de las muestras de *Colossoma macropomum* "Gamitana" se basó en los signos de un pez sano; como natación habitual, reflejos veloces, piel y escamas sanas, apetito habitual y cuerpos inalterados. Los peces presentaron pesos entre 22 y 25 gramos y con un tamaño entre 12 y 15 cm. Para la captura de los ejemplares se usó la red de bolichera o jamo mediano. La captura de los ejemplares para la extracción de la bacteria fueron introducidos en una bolsa de plástico con las siguientes medidas 90 cm de extenso por 55 cm de ancho, con una cuarta parte llena de agua y las tres cuartas partes que sobran de oxígeno. Y para los peces colectados en el Acuario la bolsa se ató con una goma elástica y se marcó la siguiente leyenda.

- Especie muestreada.
- Cantidad de muestra.
- Fecha de muestreo.
- Signos clínicos aparentes.

3.3. Criterios de selección

Criterios de selección de muestra

Dentro de los criterios de inclusión se tomó en cuenta las características de un pez sano, como, por ejemplo: natación aparentemente normal, buen aspecto físico, sin hemorragias, aletas deshilachadas entre otros signos que puedan indicar enfermedad en el pez.

Criterios de exclusión

En cuanto a los criterios de exclusión se descartaron aquellos peces que presentaban signos de alguna enfermedad, los que presentaban natación errática entre otros.

3.4. Procedimientos, técnicas e instrumentos de recolección de datos

Aislamiento e identificación de las *Aeromonas* sp.

De los peces enfermos colectados en acuarios los ejemplares de *Trachelyopterus galeatus* (4 cm) y *Astyanax* sp. (6 cm) (Fig. 1a y b), se extrajeron muestras de bazo, riñón e hígado, que se homogeneizaron y se sembraron en agar soja tripticasa (TSA) y sales de extracto de levadura de triptonas (SGP). En base de agar selectivo *Pseudomonas-Aeromonas* base, las placas se incubaron a lo largo de 48 horas a 27 °C. Las colonias bacterianas se eligieron en funcionalidad de sus aspectos morfológicos y se conservaron en TSB-glicerol al 20% a -80 °C. Se seleccionó una colonia representativa de cada piscifactoría muestreada, posteriormente se eligió una colonia representativa para un examen fenotípico. Además, se llevó a cabo pruebas de tinción de Gram (utilizando Gram Color de Merck, Alemania), actividad de catalasa (utilizando el reactivo de catalasa Liofilchem, Italia),

actividad de oxidasa (utilizando tiras de reactivo de oxidasa de Merck, Alemania), hemólisis (utilizando TSB + 5% de sangre), SIM, motilidad, utilización de azúcar, utilización de H₂S, utilización de citrato, tolerancia a la sal y ADNasa a numerosas temperaturas (15, 25 y 35). Además, se usó los kits comerciales API 20E de BioMerieux, Marcy l'Etoile, Francia, para saber los perfiles bioquímicos de las cepas recluidas.

Sacrificio de los peces

Los peces fueron puestos una sobre dosis en 90 mg/l de sal de metanosulfonato de 3 -aminobenzoato de etilo antes de la infección (MS-222, Sigma Aldrich) y además se realizó un pequeño pinchazo en la médula espinal, con mucho cuidado para evitar algunas complicaciones con la obtención de la muestra.

Infección experimental por *Aeromonas* sp.

El desarrollo de infección tuvo presente las *Aeromonas* sp., identificadas desde peces ornamentales enfermos. La cepa se sembró en caldo TSB y se cultivó en un periodo de 18 horas a 25 °C con una agitación baja (120 rpm). Ahora, la suspensión bacteriana se sometió a una centrifugación (3.000 g en un periodo de 20 minutos a 4 °C), a tres rondas de lavado y a la resuspensión en solución salina estéril tamponado con fosfato (PBS).

Los peces fueron sedados en 90 mg/l de sal de metanosulfonato de 3-aminobenzoato de etilo antes de la infección (MS-222, Sigma Aldrich). En este ensayo se utilizó quince estanques (120 L) (n = 15) con un total de 180 gamitanas (*C. macropomum*).¹⁴⁴ de estos peces se administró 0,5 mL de concentraciones de *Aeromonas* sp., C1 = 1,5 x 10⁸; C2 = 1,8 x 10⁸; C3 = 2,1

x 10⁸; C4 = 2,4 x 10⁸ y C5 = 2,7 x10⁸ células bacterianas por ml en la cavidad celómica; tubos 5 a 9 de los estándares de McFarland). A los ejemplares del grupo de control se le administró la misma proporción de solución salina estéril (0,65%).

Alteraciones clínicas, anatomopatológicas y mortalidad se registraron en un periodo de hasta 168 h después de las inoculaciones (cada 24 h). El porcentaje de mortalidad acumulada de cada grupo fue evaluado por la fórmula: [(n° muertos/n° de animales) *100]. Al final de los experimentos, los peces sobrevivientes fueron sacrificados por sobredosis de MS-222 (AVMA 2013) y se realizó el mismo análisis ⁽⁸⁾.

Análisis del espécimen *Colossoma macropomum*

Para el examen de *Colossoma macropomum* (gamitana), primero se realizó una evaluación macroscópica de las distintas lesiones externas que se hayan podido apreciar en el cuerpo; aletas, y ojos, luego se realizó una evaluación en el interior del pez. Para eso, se homogenizó muestras del bazo y del riñón de los peces enfermos, se sembró en agar glutamato-almidón-rojo de fenol, TSA suplementado con 5% de sangre de carnero desfibrada, y TSAB suplementado con TSA (GSP, Merck, Alemania). Las placas se incubaron por un periodo de 48 horas a 28 °C. Las colonias bacterianas se eligieron en funcionalidad de sus aspectos morfológicos y se almacenaron TSB-glicerol al 20 % a -80 °C.

Se analizó la reacción de Gram (Gram Color, Merck, Alemania), la actividad de la catalasa (Gram Color, Liofilchem, Italia) y la actividad de la oxidasa (tiras reactivas de oxidasa, Merck, Alemania), se utilizó los kits comerciales API 20 STREP, 50CH/B, API ZYM y 20E (BioMerieux, Marcy l'Etoile, Francia) Para

saber los perfiles bioquímicos de las cepas aisladas. El crecimiento se realizó a en un periodo de 76 horas a diferentes temperaturas (10, 15, 20, 25, 30, 35 y 40 °C) usando el caldo TSB (Difco, USA) durante un periodo de 76 horas.

Histopatología

Para el examen histológico, se fijaron y se obtuvieron las muestras de cerebro, branquias, corazón, hígado, riñón, bazo, ojos y la vejiga natatoria, se fijó en formalina tamponada neutra al 10%, para el análisis histopatológico. Los tejidos se procesaron de forma rutinaria, se selló con parafina, se seccionaron a 4 μ m y se realizó la tinción con hematoxilina y eosina (H&E).

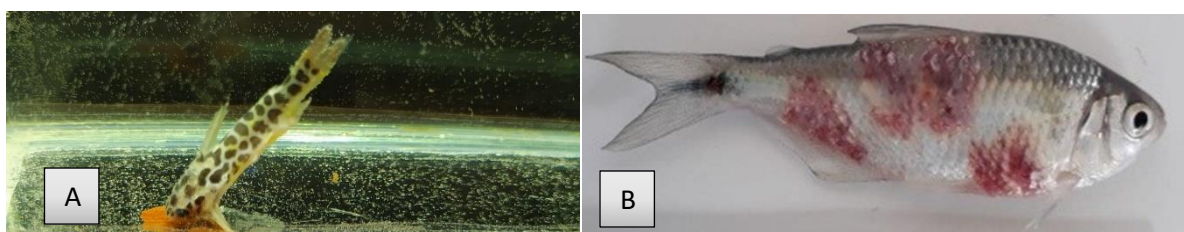


Figura 1. A. *Trachelyopterus galeatus* con hemorragias, natación errática y distensión abdominal y *Astyanax* sp con hemorragias B.

3.5. Análisis de datos

Análisis estadístico El resultado LD50–96h se estimó utilizando Trimmed Spearman-Kärber. La tasa de supervivencia siguió el método de Kaplan-Meier, correlación, y regresión lineal. El programa estadístico experimental utilizado para Los cálculos fueron por el software R, versión 3.4

3.6. Aspectos éticos

El recolección de muestras biológicas de los órganos de peces fue aprobado por el Comité de Ética y Bienestar Animal de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (CEBA - UNMSM) bajo el número de protocolo CEBA-2019-008 de acuerdo con los lineamientos para el cuidado y uso de animales de laboratorio de las leyes peruanas.

CAPITULO IV. RESULTADOS

4.1. Evaluación macroscópica de las lesiones de los principales órganos afectados por *Aeromonas* sp.

Basándose en la observación realizada a los ejemplares de *Colossoma macropomum* “gamitana” infectados con cepas de *Aeromonas* sp., se identificó las lesiones macroscópicas como el deshilachamiento o aletas incompletas, lesiones como úlceras en la piel focal y multifocal y hemorragias internas, hepatomegalia, opacidad en la córnea en los ejemplares evaluados. Dichas lesiones se pueden apreciar en las figuras 2, 3, 4 y 5.



Figura 2. Deshilachamiento de la aleta anal y caudal en ambos ejemplares de *Colossoma macropomum*, acompañado de úlceras focales y multifocales.



Figura 3. Ulceras en la región dorsal, ventral y caudal de ejemplar de *Colossoma macropomum* ocasionado por la bacteria *Aeromonas* sp.



Figura 4. Hemorragia en la aleta pectoral de *Colossoma macropomum*



Figura 5. Hemorragia interna, hepatomegalia (A), opacidad de la córnea (B).

4.2. Identificación de las *Aeromonas* sp.

Inicialmente se realizó la descripción morfológica de las colonias, las cuales presentaron borde regular, apariencia lisa y brillante, superficie convexa, color crema blanquecina y mucosas (Figura 6). Microscópicamente, las colonias aisladas presentaron morfología típica de *Aeromonas* sp, bacilos Gram negativos cortos. El análisis bioquímico mostró algunas diferencias entre ambos aislados, principalmente en la utilización de citrato, hidrólisis de esculina, tolerancia a la sal (Tabla 1).



Figura 6. Colonias aisladas de la bacteria *Aeromonas* sp.

Tabla 1. Caracterización bioquímica del aislado 14 (*Trachelyopterus galeatus*), aislado 17(*Astyanax* sp) y ATCC 35654.

CEPA	ATCC 35654	14	17
GRAM	Bacilos Cortas -	Bacilos Cortas -	Bacilos Cortas -
CATALASA	+	+	+
OXIDASA	+	+	+
HEMOLISIS (AGAR SANGRE)	+β	+β	+β
PRUEBA DEL VP VOGES PROSKAUER	+	+	+
SIN (INDÓL)	+	+	+
MOTILIDAD	+	+	+
PRODUCCIÓN DE HaS	-	-	-
UTILIZACIÓN DE CITRATO	-	+	-
HIDROLISIS DE ESCULINA	+	-	+
CLORURO DE SODIO 1%	+	+	+
CLORURO DE SODIO 2%	+	-	+
CLORURO DE SODIO 3%	+	-	+
CLORURO DE SODIO 4%	+	-	+
CLORURO DE SODIO 5%	-	-	-
CRECER 24 °C	+	+	+
CRECER 28 °C	+	+	+
CRECER 37 °C	+	+	+
CRECER 42 °C	+	+	+
CÓDIGO API 20E	-	7246124	7046127

4.3. Hallazgos histológicos producidas por la bacteria *Aeromonas* sp., inoculadas en distinta dosis en *Colossoma macropomum* “Gamitana.

Los que se pudo observar en el examen histopatológico de los ejemplares de *Colossoma macropomum* fueron principalmente, necrosis con cariólisis, pérdida de la delimitación citoplasmática de las células de los túbulos renales y hepatocitos, hemorragia, edema celular, presencia de colonias bacterianas en riñón y hígado con infiltrados leucocitarios (Figuras 7).

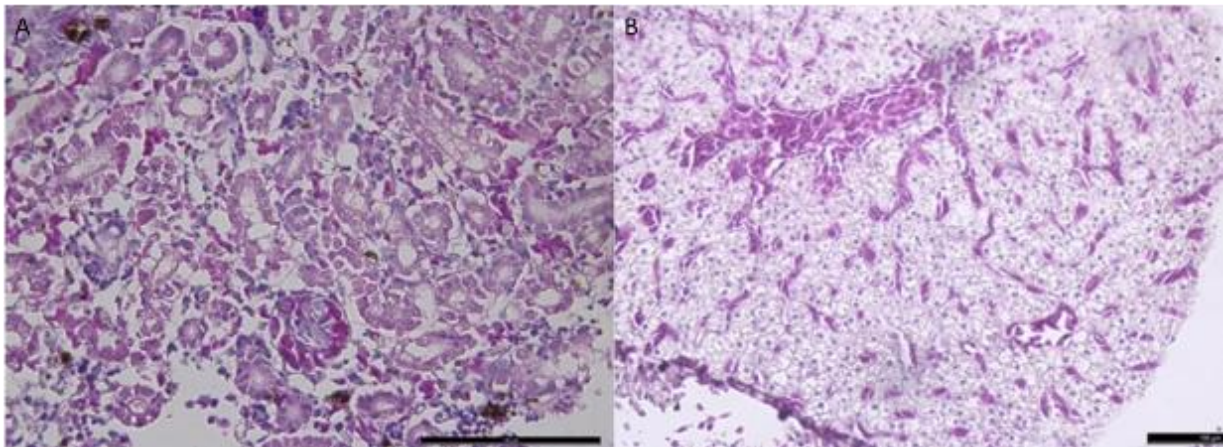


Figura 7. A. Hallazgos histopatológicos en *Colossoma macropomum*. Necrosis de la Degeneración renal e hidrópica. Tinción con hematoxilina y eosina y B. Hallazgos histopatológicos en *Colossoma macropomum*. Hemorragia necrosis en el hígado. Tinción con hematoxilina

4.4. Determinación de la DL50 de *Aeromonas* sp., en *Colossoma macropomum*.

Tabla 2. Efectos clínicos de acuerdo a las concentraciones de la DL50 de *Aeromonas* sp. En *Colossoma macropomum* a los días de evaluación.

(A) <i>Aeromonas veronii</i>	
CONCENTRACIONES	SIGNOS CLÍNICOS/HORAS
10²	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Pérdida de coloración 24h. ✓ Descamación 48h.
10⁴	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Descamación. ✓ Hemorragia ocular 72h. ✓ Úlceras focales a partir de las 72h.
10⁶	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Muerte de manera diminuta de los peces 24h. ✓ Descamación 48h. ✓ Hemorragia ocular 48h. ✓ Úlceras focales 72h.
10⁸	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Muerte 24h (algunos ejemplares) ✓ Hemorragia ocular 24h. ✓ Úlceras focales y multifocales 48h. ✓ Abultamiento en la parte ventral 72h. ✓ Ascitis 72h.
(B) <i>Aeromonas hydrophila</i>	
CONCENTRACIONES	SIGNOS CLÍNICOS/HORAS
10²	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Pérdida de coloración 24h. ✓ Hemorragia ocular 48h. ✓ Úlceras focales 72h.
10⁴	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Pérdida de coloración 24h. ✓ Hemorragia ocular 48h. ✓ Descamación 48h. ✓ Úlcera focal 72h. ✓ Hemorragia por todo el cuerpo 72h. ✓ Muerte de algunos ejemplares 96h.
10⁶	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Muerte de algunos ejemplares 24h. ✓ Hemorragia ocular 24h. ✓ Descamación 48h. ✓ Úlcera focal y multifocal 72h. ✓ Hemorragia por todo el cuerpo 72h. ✓ Ascitis 72h.
10⁸	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Muerte de todos los individuos 24h.

En la siguiente tabla muestra las distintas concentraciones que se le inocularon a *Colossoma macropomum*, donde las evaluaciones macroscópicas se le hicieron cada 24 horas, teniendo 10² como la dosis con menos concentración de células bacterianas en la cavidad celómica, concentraciones de 10⁴ y 10⁶ conforme los días pasaban los signos clínicos iban en aumento y 10⁸ como la mayor concentración de células bacterianas causando la muerte de algunos de los individuos con (A) *Aeromonas veronii* y caso contrario de (B) *Aeromonas hydrophila*. Mostró ser mucho más patógeno, sin embargo presentaron similares casos clínicos, se cumple que a mayor concentración hubo más muerte, para complementar el presente estudio se detalla en la Figura 8.

En el caso del porcentaje de supervivencia se pudo observar mortalidad en los individuos de *Colossoma macropomum* infectados con cepas de *Aeromonas* sp.

La DL50-96 de *Aeromonas veronii* sobre *Colossoma macropomum* se estimó en 24×10^6 CFU mL⁻¹ y con su límite inferior y superior en $0,7965 \times 10^6$ y $73,38 \times 10^6$ CFU mL⁻¹ y de *Aeromonas hydrophila* se estimó en $1,408 \times 10^5$ CFU mL⁻¹ y con su límite inferior y superior en 0.4905×10^5 y 4.041×10^5 UFC mL⁻¹ (Figuras 8A y 8B).

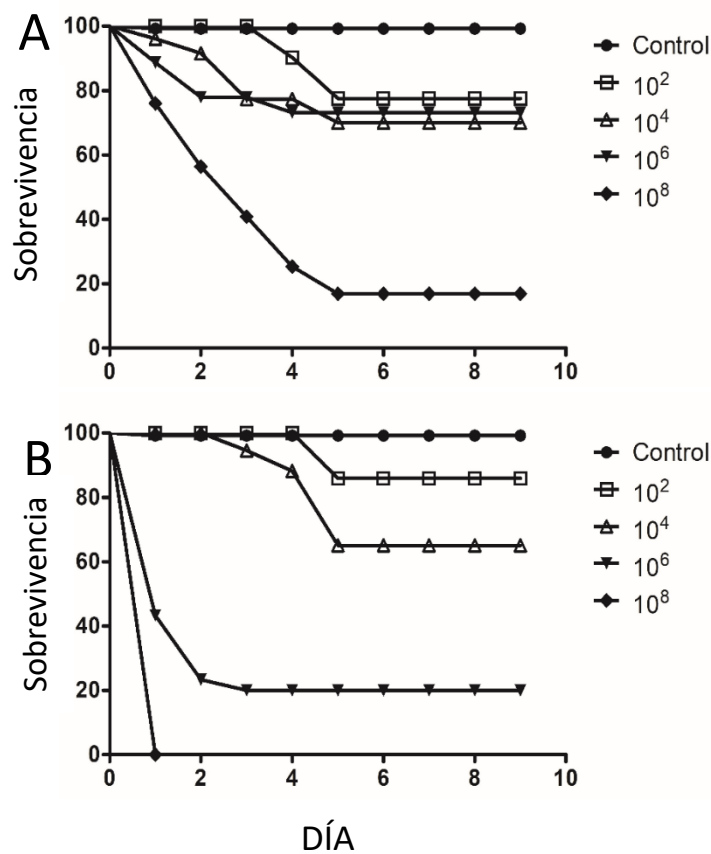


Figura 8. Sobrevivencia de *Colossoma macropomum* experimentalmente infectado con *Aeromonas veronii* aislada de *Trachelyopterus galeatus* (A) y con *Aeromonas hydrophila* aislada de *Astyanax* sp (B).

CAPÍTULO V. DISCUSIÓN

En la mayoría de los casos no se realiza un control de enfermedades o un análisis exploratorio para determinar el estado de salud de los animales. Algunos de estos peces podrían estar incubando una enfermedad, infectando a otros peces, e incluso sin signos clínicos aparentes. Algunos estudios han determinado los riesgos de esta situación, Whittington (2007) donde advierte sobre la posibilidad de que una enfermedad de los peces ornamentales ingrese a un país y se propague al medio natural por una infección masiva. En ambos casos, la bioseguridad transfronteriza y la biodiversidad de peces y patógenos son los principales factores de riesgo.

En el presente estudio reportamos, por primera vez en Perú, la presencia de dos bacterias patógenas aisladas de peces ornamentales evaluados en un periodo de 168 horas. (*Trachelyopterus galeatus* y *Astyanax* sp) capaces de infectar peces tropicales de acuicultura (*Colossoma macropomum*), la principal especie de peces nativos cultivados en el país. De las dos bacterias aisladas, presentaron signos clínicos similares, lo que sugiere que la mayoría de las especies de *Aeromonas* pueden producir el mismo cuadro clínico independientemente de las especies de peces afectadas. En *Astyanax* sp también se ha reportado antes signos clínicos causados por *A. hydrophila* similares a los observados en este estudio, principalmente hemorragias y úlceras cutáneas (Alvarez. 2020). Este es el primer reporte de un patógeno bacteriano en *Trachelyopterus galeatus*. Sin embargo no es posible realizar un diagnóstico definitivo simplemente observando los signos clínicos, es necesario realizar ensayos bioquímicos y moleculares.

En un estudio se usaron dos aislados de *Aeromonas* sp. La mayoría de estos signos clínicos y lesiones observados están relacionados con los factores de virulencia presentes en el género *Aeromonas* (Claudio. 2019). Sin embargo, la variación observada en este grupo no se limita solo a los factores de virulencia, la variedad en el perfil bioquímico es típica de este género (Claudio 2020). Las diferencias observadas en la utilización de citrato, las pruebas de hidrólisis de esculina y la tolerancia a la sal pueden estar relacionadas con la capacidad de la bacteria para sobrevivir en diferentes circunstancias y ambientes hostiles. Además, las diferencias en la tolerancia a la sal de estas bacterias pueden explicar por qué el uso de sal reportado por los acuicultores para controlar algunas infecciones no siempre es útil.

Aeromonas hydrophila es una bacteria bien conocida que afecta a esta especie de pez (Gallani, 2020). Sin embargo, esta es la primera vez que se comprueba que una *A. hydrophila* aislada de una *Astyanax* sp infecta a *C. macropomum*. Es importante señalar que *Astyanax* sp se usa mucho en Brasil y Perú como carnada viva y alimento para peces carnívoros (Álvarez, 2020), lo que explica por qué es tan común encontrar esta especie en las instalaciones acuícolas. La mortalidad y DL50 observada en la infección experimental mostró el alto potencial de estas bacterias para infectar a *C. macropomum* y causar una elevada mortalidad. Otras especies de *Aeromonas* han causado tasas de mortalidad similares en peces tropicales. Dong. (2017) observaron que las tilapias eran infectadas con $8,9 \times 10^5$ UFC/mL de *A. veronii* causaron 50% de mortalidad en un par de días y Chen. (2019) reportaron la misma mortalidad con 13.1×10^6 UFC/mL de *A. veronii* en carpa cruciana.

Sin embargo, otros autores revelaron niveles más altos de DL50 de especies de *Aeromonas* en *Brycon amazonicus* (Oliveira. 2011), *Piaractus mesopotamicus* (Claudio. 2020a) y *Arapaima gigas* (Dias. 2016), lo que sugiere diferencias en la susceptibilidad por especie y cepa bacteriana.

La variedad de peces ornamentales y patógenos, la cercanía a los peces de piscifactoría y el transporte mundial de estas especies, las convierte en un importante factor de riesgo para la propagación de enfermedades de los peces. A esto hay que sumar la falta de control por parte de los organismos gubernamentales de sanidad animal. Si no se promueven medidas de control de riesgos a nivel mundial, la posibilidad de propagación de enfermedades permanecerá y es posible que siga afectando económicamente no solo a los productores de peces ornamentales sino también a los de la acuicultura e incluso al medio natural.

CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES

1. *Aeromonas veronii* y *A. hydrophila* pueden tener un impacto negativo en peces nativos de piscifactoría como *C. macropomum* y causan una alta mortalidad, como se demostró por los objetivos experimentales y observaciones de campo, Los peces ornamentales pueden actuar como reservorios de estas bacterias, lo que representa un importante riesgo de propagación de enfermedades de los peces.
2. Se concluye que las lesiones macroscópicas que se aprecian en los ejemplares de *Colossoma macropomum* a raíz de la infección con cepas de *Aeromonas* sp., son: ascitis, aletas deshilachadas generalmente en la aleta anal y caudal, úlceras focales, multifocales y hemorragia ocular.
3. Las características principales para la identificación de *Aeromonas* sp. se basaron inicialmente en las características morfológicas de las colonias y la coloración Gram de las mismas.
4. Las lesiones histopatológicas principales que se pudieron apreciar fueron: necrosis, pérdida de la delimitación citoplasmática de las células de los túbulos renales y hepatocitos, hemorragias y edema celular.
5. Se concluye que la DL50-96 de *Aeromonas veronii* sobre *Colossoma macropomum* se estimó en 24×10^6 CFU mL⁻¹ y de *Aeromonas hydrophila* se estimó en $1,408 \times 10^5$ CFU mL⁻¹.

CAPÍTULO VII. RECOMENDACIONES

- La información disponible sobre la infección experimental de bacterias en *Colossoma macropomum* todavía es muy poco estudiada, por lo que se recomienda continuar con los estudios a largo plazo.
- El estudio de la DL50 y la infección experimental en peces ornamentales y de cultivos son de suma importancia, para comprender la dinámica de estas enfermedades, que nos permitan elaborar medidas de control y evitar daño económico a los piscicultores, por lo que se recomienda incentivar nuevas investigaciones relacionadas a la infección experimental en otras especies de peces de gran importancia comercial.
- Se recomienda tomar las medidas de control de estas bacterias donde aparezcan enormes brotes, para así saber y determinar más a detalle la intensidad o grado patológico de esta bacteria, afectando a los peces ornamentales y de cultivo.
- Realizar más evaluaciones macroscópicas en peces que presenten síntomas clínicos causados por el género *Aeromonas* sp y hacer más descripciones de las lesiones histológicas de órganos específicos para saber el grado de daño que causan a los órganos internos del pez ornamental asimismo a los peces de cultivo.

CAPÍTULO VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. García Dávila C, Sánchez Riveiro H, Flores Silva MA, Mejía de Loayza E, Angulo Chávez C, Castro Ruiz D, et al. Peces de consumo de la Amazonía peruana [Internet]. Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana. Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana; 2018 [citado 6 de junio de 2021]. Disponible en: <http://repositorio.iiap.gob.pe/handle/20.500.12921/369>
2. Ortiz N, Iannacone J. Estado actual de los peces ornamentales amazónicos del Perú que presentan mayor demanda de exportación. *The Biologist*. Vol. 2008;6.
3. Tello-Martín JS, Serna JRCDL. Estado actual de la explotación de los principales peces ornamentales de la Amazonia Peruana. *Folia Amazónica*. 1 de diciembre de 1991;3(1-2):107-28.
4. Murrieta Morey G. Parasitología en peces de la Amazonía: fundamentos y técnicas parasitológicas, profilaxis, diagnóstico y tratamiento [Internet]. Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana. Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana; 2019 [citado 3 de junio de 2021]. Disponible en: <http://repositorio.iiap.gob.pe/handle/20.500.12921/394>
5. Álvarez-León R. Asociaciones y patologías en los peces dulceacuícolas, estuarinos y marinos de Colombia: aguas libres y controladas. *Boletín Científico Centro de Museos Museo de Historia Natural*. noviembre de 2007;11(1):81-129.

6. Alcalá Moya MG. Pescadores en América Latina y El Caribe. Espacio, población, producción y política vol. 2. 2011.
7. Zepeda-Velázquez AP. *Aeromonas* spp.: la infección en la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y su aislamiento en México. Revista AquaTIC. 21 de septiembre de 2016;(42):01-16.
8. Claudiano GS, de Moraes FR, Fernandes DC, Vantini JS, Yunis-Aguinaga J, Eto SF, et al. Experimental infection by *Aeromonas hydrophila* in *Piaractus mesopotamicus*: DL50, neurological disturbances, and mortality. Comp Clin Pathol. 1 de diciembre de 2020;29(6):1119-26.
9. Ramos E F, Sandoval C N, Morales C S, Contreras S G, Manchego S A. Lesiones Histopatológicas y Aislamiento Bacteriológico en Gamitanas (*Colossoma macropomum*) Aparentemente Sanas. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú. enero de 2016;27(1):188-95.
10. Citterio B, Biavasco F. *Aeromonas hydrophila* virulence. Virulence. 4 de julio de 2015;6(5):417-8.
11. Vásquez-Piñeros MA, Rondón-Barragán IS, Restrepo-Betancur LF, Eslava-Mocha PR. Estudio clínico y hematológico de una infección experimental con *Aeromonas hydrophila* y *Edwardsiella tarda* en tilapia, *Oreochromis* sp. ORINOQUIA. junio de 2010;14(1):33-44.
12. Palacios H S, Sandoval C N, Bueno M C, Manchego S A. Estudio Microbiológico e Histopatológico en Peces Tetra Neón (*Paracheirodon innesi*) de la Amazonía Peruana. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú. septiembre de 2015;26(3):469-83.

13. Escandell C, Sánchez P. Caracterización del cuadro clínico, Leucograma diferencial y hallazgos de Necropsia en Tilapias nilóticas (*Oreochromis Niloticus*) infectadas experimentalmente con *Aeromonas Hydrophila* (Bacteria: Aeromonadaceae). 2017 [citado 15 de febrero de 2023]; Disponible en: <https://bibliotecadigital.fvet.edu.uy:8080/xmlui/handle/123456789/1453>
14. Perretta A, Antúnez K, Zunino P. Antimicrobial resistance in motile aeromonads isolated from fishes cultured in Uruguay. *Veterinaria* (Montevideo). junio de 2019;55(211):4-8.
15. Llanos C, Monteza C, Scotto C. Determinación de la concentración letal media (CL50) y eficacia del eugenol como anestésico sobre *xiphophorus helleri* (heckel, 1848) (Cyprinodontiformes: Poeciliidae). *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. diciembre de 2012;23(4):429-40.
16. Cayulla Quispe DB. Identificación de monogeneos en juveniles de *Colossoma macropomum* “gamitana” y *Piaractus brachypomus* “paco” procedentes del distrito de Tambopata, Madre de Dios. Universidad Nacional Mayor de San Marcos [Internet]. 2018 [citado 15 de febrero de 2023]; Disponible en: <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/10021>
17. Goulding M, Carvalho ML. Life history and management of the tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characidae): an important Amazonian food fish. *Rev Bras Zool*. 1982; 1:107-33.

18. Campos Baca L. El cultivo de la gamitana en Latinoamérica [Internet]. Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana. Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana; 2015 [citado 15 de febrero de 2023]. Disponible en: <https://repositorio.iiap.gob.pe/handle/20.500.12921/108>
19. Tello S. Situación actual de la pesca y la acuicultura en Madre de Dios. Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana. 2002; programa de Ecosistemas Acuáticos (PEA). Iquitos, 22.
20. Vargas L M, Sandoval C N, Casas A E, Pizango P G, Manchego S A. Parásitos y Lesiones Histopatológicas en Branquias de Gamitanas (*Colossoma macropomum*) Juveniles bajo Crianza Semiintensiva. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú. diciembre de 2015;26(4):577-86.
21. Pérez R, Romeu B, Lastre M, Morales Y, Cabrera O, Reyes L, et al. Inmunopotenciadores para la acuicultura. Vaccimonitor. abril de 2014;23(1):24-31.
22. Alperi Vega A. Taxonomía y epidemiología del género *aeromonas* [Internet] [Ph.D. Thesis]. TDX (Tesis Doctorals en Xarxa). Universitat Rovira i Virgili; 2009 [citado 15 de febrero de 2023]. Disponible en: <https://www.tdx.cat/handle/10803/37329>
23. Castro-Escarpulli G, Aguilera-Arreola MG, Cerezo SG, Hernández-Rodríguez CH, Chacón MR, Falgás LS, et al. El género *Aeromonas*. ¿Un patógeno importante en México? Enf Infec Microbiol. 2002;22(4):206-16.

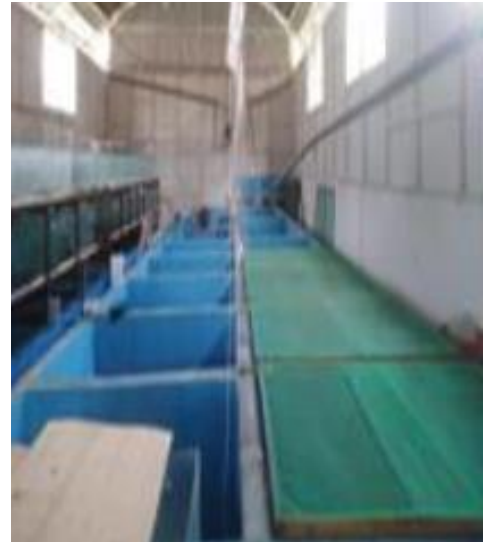
24. Mancini M, Rodriguez C, Finola M, Basualdo C, Prospero C. Mortandad de peces en un lago recreacional del sur de Córdoba, Argentina. Revista AquaTIC [Internet]. 6 de septiembre de 2016 [citado 15 de febrero de 2023];(11). Disponible en: <http://revistaaquatic.com/ojs/index.php/aquatic/article/view/97>
25. Pérez Nicado R. Vacunación oral de *Clarias gariepinus* (Siluriformes: Clariidae) con bacterina de *Aeromonas hydrophila* administrada con adyuvantes AFCo3a y AFCo3b. [Internet] [Thesis]. Universidad Central «Marta Abreu» de Las Villas; 2012 [citado 15 de febrero de 2023]. Disponible en: <http://dspace.uclv.edu.cu:8089/xmlui/handle/123456789/1822>
26. Aguilar-García CR. Infección de piel y tejidos blandos por el género *Aeromonas*. Med Int Mex. 1 de diciembre de 2015;31(6):701-8.
27. Trust TJ, Bull LM, Currie BR, Buckley JT. Obligate Anaerobic Bacteria in the Gastrointestinal Microflora of the Grass Carp (*Ctenopharyngodon idella*), Goldfish (*Carassius auratus*), and Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). J Fish Res Bd Can. octubre de 1979;36(10):1174-9.
28. Holmes S. Henderson diccionario de términos biológicos. 1985.

ANEXOS

Anexo 1. Recolección de peces ornamentales enfermos en los acuarios.



Anexo 2. *Colecta de los ejemplares de Colossoma macropomum* y lugar acondicionamiento de los mismos.



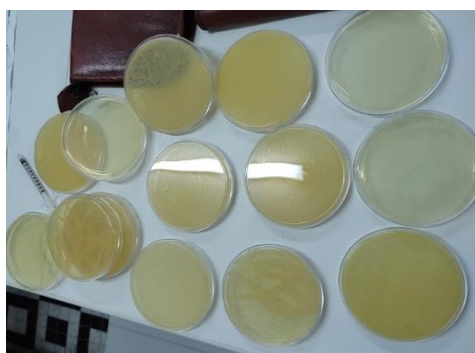
Anexo 3. Aislamiento e identificación de *Aeromonas* sp.



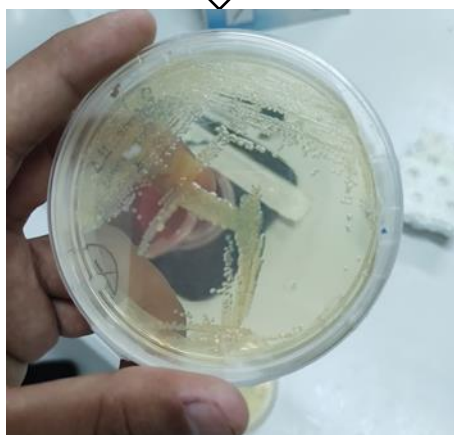
1. Identificación de los ejemplares para la extracción de *Aeromonas* sp.



2. extracción y homogenización de los órganos.



3. Sembró en agares nutritivos que permita el crecimiento de la Bacteria en estudio.

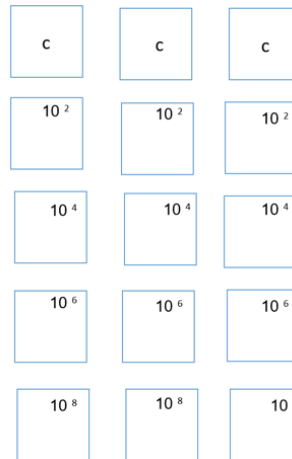
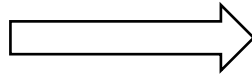


4. selección de las colonias bacterianas en funcionalidad de su aspecto morfológico.



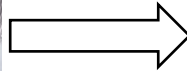
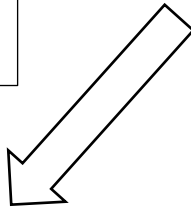
5. Se eligió las colonias representativas para su examen fenotípico

Anexo 4. Infección experimental a *Colossoma macropomum* por *Aeromonas Sp.*



2. Se acondicionó en 15 piscinas de 120 lt, con las condiciones óptimas para poner a los ejemplares *Colossoma macropomum* una vez inoculados con *Aeromonas Sp.*

1. se cultivó a lo largo de 18 horas a 25 °C con una agitación baja (120 rpm). Producto de suspección se inoculo a *Colossoma macropomum*.



3. se inocularon colocando al ejemplar de la manera ventral del pez hacia arriba para poder administrar células bacterianas en la cavidad celómica.

4. 144 de estos peces se administró 0,5 mL de concentraciones de *Aeromonas sp.*, C1 = $1,5 \times 10^8$; C2 = $1,8 \times 10^8$; C3 = $2,1 \times 10^8$; C4 = $2,4 \times 10^8$ y C5 = $2,7 \times 10^8$, las mismas concentraciones para 36 ejemplares de la prueba de control con suero fisiológico (0.65%).

Anexo 5. Análisis de *Colossoma macropomum* infestados con *Aeromonas* sp.



1. Se realizó una evaluación macroscópica de las distintas lesiones externas y evaluación en el interior del pez.

3. Se incubaron a lo largo de 48 horas a 28 °C. Y se almacenaron TSB-glicerol al 20 % a -80 °C.



2. Se sembró en agar glutamato-almidón-rojo de fenol, TSA suplementado con 5% de sangre de carnero desfibrada, y TSAB suplementado con TSA



4. El proceso habitual para la fijación de los tejidos se realizó mediante la incrustación con queroseno, la parte de 4 um y la tinción con hematoxilina y eosina