

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA ACADÉMICA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA EN ACUICULTURA  
INFORME DE TESIS**



***Identificación bioquímica y susceptibilidad antimicrobiana de bacilos Gramnegativos presentes en la primera etapa del proceso productivo en hatchery de alevines de Arapaima gigas "Paiche" en Pucallpa – Ucayali, Perú.***

**TESIS PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE BIOLOGIO ACUICULTOR**

**AUTOR: Bach. Marielva Morayma Melendez Cerrinos**

**ASESOR: Dr. Carlos Alberto Azañero Díaz**

**Nuevo Chimbote, 2017**

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA ACADÉMICA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA EN ACUICULTURA  
INFORME DE TESIS



**TESIS PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE BIOLOGIO ACUICULTOR**

Identificación bioquímica y susceptibilidad antimicrobiana de bacilos Gramnegativos presentes en la primera etapa del proceso productivo en hatchery de alevines de *Arapaima gigas* "Paiche" en Pucallpa – Ucayali, Perú.

Revisado y aprobado:

---

**M. Sc. Ángel Castro Alvarado**  
**PRESIDENTE**

---

**Blgo. Acui. Sorayda Mendoza Espinoza**  
**SECRETARIA**

---

**Dr. Carlos Alberto Azañero Díaz**  
**INTEGRANTE**

**Nuevo Chimbote, 2017**

## **DEDICATORIA**

*Dedico este trabajo principalmente a Dios, por haberme dado la vida y permitirme llegar hasta este momento tan importante de la vida.*

*A mi madre, por ser el pilar más importante de la familia y por demostrarme su apoyo incondicional.*

*A mi padre por ser el hombre que me inculcó sus valores y el amor a la familia, por sus consejos y regaños.*

*A mis hermanos y hermana que siempre están a mi lado en los mejores y peores momentos.*

**Meléndez Cerrinos Marielva Morayma**

## **AGRADECIMIENTOS**

*Al Ing. Jorge Moya Cañas, Gerente General de AMAZON FISH PRODUCTS S.A. por su apoyo profesional, por su amistad y por darme la oportunidad de desarrollarme profesionalmente en el ámbito del desarrollo de la acuicultura del paiche.*

*Al Blgo. Luis Henostroza Miranda, Gerente de Producción de AMAZON FISH PRODUCTS S.A. por sus enseñanzas en la producción del paiche, por ser parte importante de mi formación personal, por sus valiosos consejos y sobre todo por su amistad brindada.*

*A mi asesor Dr. Carlos Azañero Díaz, docente de la Universidad Nacional del Santa, por impartir los conocimientos necesarios para la realización de este trabajo de investigación, así como, por sus consejos, tiempo y dedicación.*

*Al M.Sc. Willian Capa Robles, docente de la Universidad Nacional del Santa, por su amistad, consejos y apoyo brindado.*

*Gracias a mi buen amigo Gustavo Rojas Salvador por su apoyo desinteresado, por sus consejos y por siempre darme la mano cuando es necesario.*

*Gracias a todas las personas que ayudaron directa e indirectamente en la realización de este informe de tesis.*

## INDICE

DEDICATORIA-----	i
AGRADECIMIENTOS-----	ii
INIDICE DE FIGURAS-----	iv
INDICE DE TABLAS-----	v
INDICE DE ANEXOS-----	vi
RESUMEN-----	vii
ABSTRACT-----	viii
I. INTRODUCCION-----	1
II. MATERIALES Y METODOS-----	6
2.1. Localización del área de trabajo-----	6
2.2. Obtención, transporte del material biológico-----	6
2.3. Preparación de las muestras para el análisis bacteriológico-----	8
- <i>Recuento de bacterias Gramnegativas</i> -----	8
2.4. Aislamiento y obtención de colonias puras-----	10
2.5. Identificación de bacilos Gram negativos con sistema API 20E-----	10
2.6. Susceptibilidad antimicrobiana-----	11
2.7. Análisis estadístico:-----	11
III. RESULTADOS-----	12
IV. DISCUSIONES-----	20
V. CONCLUSIONES-----	25
VI. RECOMENDACIONES-----	26
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS-----	27
ANEXOS-----	30

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Localización de Laboratorios Natura Analítica S.A.C en Pucallpa - Ucayali, Perú. ....	6
Figura 2. Flujograma de la preparación de las muestras para la realización del recuento bacteriano.....	9
Figura 3. Aislamiento y siembra de cultivos puros en tubos de ensayo con medio TSA .....	10
Figura 4. a) Cultivos puros en medio TSA. b) Siembra de cultivo puro en galería API 20E .....	10
Figura 5. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana de los cultivos puros en medio Muller Hinton (Sacsquispe & Velásquez, 2002). ....	11
Figura 6. a) Alevines de <i>A. gigas</i> con evidencia de natación aletargada. b) Cambio en la coloración de la piel e hinchazón abdominal. ....	12
Figura 7. Crecimiento bacteriano en medio Muller Hinton de la muestra de agua de cultivo en el primer y segundo muestreo. ....	16
Figura 8. a) Susceptibilidad antimicrobiana de <i>Edwardsiella tarda</i> . b) Resistencia de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> frente a Cefalotina. ....	17

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valores promedios de los parámetros físico químicos del agua de cultivo de <i>A. gigas</i> “Paiche” durante la primera etapa de su cultivo en hatchery en Pucallpa, Ucayali - Perú -----	12
Tabla 2. Identificación de bacilos Gramnegativos, con API20E, presentes en la primera etapa del proceso productivo en hatchery de alevines de <i>A. gigas</i> en Pucallpa – Ucayali, Perú.-----	14
Tabla 3. Identificación bioquímica con sistema API 20E de bacilos Gramnegativos presentes en la primera etapa del proceso productivo en hatchery de alevines de <i>A. gigas</i> en Pucallpa – Ucayali, Perú.-----	14
Tabla 4. Bacilos Gramnegativos presentes en agua, alimento y alevines de <i>A. gigas</i> en Pucallpa – Ucayali, Perú.-----	15
Tabla 5. Recuento de bacilos Gramnegativos presentes en agua, alimento y alevines en la primera etapa del proceso productivo en hatchery de alevines de <i>A. gigas</i> en Pucallpa – Ucayali, Perú.-----	16
Tabla 6. Promedio de los recuentos totales expresados en Log <sub>10</sub> UFC/mL de bacilos Gramnegativos presentes en la primera etapa del proceso productivo en hatchery de alevines de <i>A. gigas</i> en Pucallpa – Ucayali, Perú. -----	17
Tabla 7. Susceptibilidad antimicrobiana por discos de difusión de bacilos Gramnegativos presentes en la primera etapa del proceso productivo en hatchery de alevines de <i>A. gigas</i> en Pucallpa - Ucayali, Perú. -----	18
Tabla 8. Valores de los diámetros de la susceptibilidad antimicrobiana de bacilos Gramnegativos presentes en la primera etapa del proceso productivo en hatchery de alevines de <i>A. gigas</i> en Pucallpa – Ucayali, Perú.-----	19
Tabla 9. Valores de los diámetros de la acción inhibitoria de los antimicrobianos sobre el crecimiento de bacilos Gramnegativos presentes en la primera etapa del proceso productivo en hatchery de alevines de <i>A. gigas</i> en Pucallpa - Ucayali, Perú. -----	19

## INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Galería API 20E incluye 20 micro tubos que contienen sustratos deshidratados -----	312
Anexo 2. Discos de sensibilidad antimicrobiana para bacterias Gramnegativas-----	32
Anexo 3. Identificación al 99.9 % de Plesiomonas shigelloides con el sistema API 20E -----	33
Anexo 4. Bacterias Gramnegativas identificadas de las muestras de agua, nauplios de Artemia y alevines de paiche, con el sistema API 20E -----	34

## RESUMEN

Se identificó bioquímicamente y evaluó la sensibilidad antimicrobiana de bacilos gramnegativos hallados en muestras de alevines de *Arapaima gigas* paiche, nauplios de *Artemia sp.*, alimento extrusado comercial, agua de pozo y del agua de cultivo de los alevines de paiche; a partir de estas muestras se realizó el recuento bacteriano por diluciones seriadas y siembra en superficie en agar MacConkey y el aislamiento de colonias puras para su identificación con el sistema miniaturizado API20E para bacilos Gramnegativos, que fueron identificadas mediante el programa APIWEB de donde se reportó la presencia de bacterias del género *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Vibrio*, *Bordetella*, *Eikenella*, *Aeromonas*, *Plesiomonas* y *Edwardsiella*. Se determinó la sensibilidad antimicrobiana, existiendo diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) según la prueba de Tukey entre los bacilos Gramnegativos más sensibles a los antimicrobianos como *Edwardsiella tarda* y *Plesiomonas shigelloides* y los menos sensibles como *Pseudomonas fluorescens* y *Stenotrophomonas maltophilia*; de igual manera se obtuvo que los antibacterianos más efectivos contra los bacilos Gramnegativos encontrados en la primera etapa del proceso productivo en hatchery de alevines de *A. gigas* fueron Ciprofloxacino y Ceftazidima y el menos efectivo fue Cefalotina.

**PALABRAS CLAVE:** Identificación bioquímica, bacilos gramnegativos, sensibilidad antimicrobiana, antibacterianos, hatchery, alevines, *Arapaima gigas*.

## ABSTRACT

Biochemically identified and evaluated the antimicrobial sensitivity of gram-negative bacilli found in samples of fingerlings of *Arapaima gigas* paiche, nauplii de *Artemia* sp., food commercial extruded, water well & water from paiche fingerlings cultivation; starting from these samples is carried out the count bacterial by dilutions serial and sowing in surface in agar MacConkey and the isolation of colonies pure for its identification with the system miniaturized API20E for bacilli gramnegative, that were identified through the program APIWEB of where is reported the presence of bacteria belonging to *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Vibrio*, *Bordetella*, *Eikenella*, *Aeromonas*, *Plesiomonas* and *Edwardsiella*. Determined the antimicrobial sensitivity, there are significant differences ( $P < 0.05$ ) according to the Tukey test between the more sensitive gram-negative antimicrobial as *Edwardsiella tarda* and *Plesiomonas shigelloides* and less sensitive as *Pseudomonas fluorescens* and *Stenotrophomonas maltophilia*; Similarly obtained the antibacterial more effective against gram-negative bacilli found at the first stage of the production process in hatchery fingerlings of *A. gigas* were Ceftazidime and ciprofloxacin and the least effective was Cephalothin.

Key words: Biochemical identification, gram-negative bacilli, antimicrobial sensitivity, antibacterial, hatchery, fingerlings, *Arapaima gigas*.

## I. INTRODUCCION

La producción mundial de pescado sigue creciendo a un ritmo más rápido que la población mundial y la acuicultura se mantiene como uno de los sectores de producción de alimentos de más rápido crecimiento; en 2012, la acuicultura estableció otro máximo histórico de producción y ahora proporciona casi la mitad del pescado destinado a la alimentación humana (FAO, 2014). La oferta mundial *per capita* de pescado alcanzó un nuevo máximo histórico de 20 kg en 2014, gracias a un intenso crecimiento de la acuicultura, que en la actualidad proporciona la mitad de todo el pescado destinado al consumo humano, y a una ligera mejora de la situación de determinadas poblaciones de peces como consecuencia de una mejor ordenación pesquera (FAO, 2016).

A nivel mundial, la acuicultura se desarrolla en tres tipos de ambientes acuáticos, marinos, continentales y salobres y de estas, la producción que ha tenido un mayor crecimiento ha sido la realizada en los ambientes continentales (PRODUCE, 2011); a lo que la FAO (2016) indica que en 2014 la producción de animales acuáticos procedentes de la acuicultura ascendió a 73,8 millones de toneladas, con un valor de primera venta estimado de 160.200 millones de USD. Este total se compuso de 49,8 millones de toneladas de peces de escama (99.200 millones de USD), 16,1 millones de toneladas de moluscos (19.000 millones de USD), 6,9 millones de toneladas de crustáceos (36.200 millones de USD) y 7,3 millones de toneladas de otros animales acuáticos como los anfibios (3.700 millones de USD).

En el Perú es posible dividir la acuicultura en dos grupos: la que se realiza en aguas marinas (maricultura) y la que se efectúa en aguas dulces (acuicultura continental). Dos de las tres especies con mayor producción en el 2012 provienen de la maricultura (34.3% en conchas de abanico y 24.6% en langostinos), mientras que en cuanto a la acuicultura continental sólo la trucha tuvo una participación significativa, con 34.3%, aunque se ha percibido crecimiento en industrias nacientes, como la tilapia, el paiche y la gamitama (Belaunde & Reto, 2014). En la Amazonía peruana se consume al año unas 80 000 toneladas de pescado, lo que es parte de la seguridad alimentaria en la región y una gran fuente de trabajo para las comunidades locales de pescadores.

Con referencia a *Arapaima gigas* “paiche”, esta especie, pertenece a la familia *Arapaimidae*, es el pez de escama más grande de las cuencas del Amazonas, el Orinoco, en Venezuela y el Essequibo, en Guyana; en su medio natural puede alcanzar hasta tres metros de longitud y 250 kg de peso y a pesar de su gran tamaño se le puede cultivar con buenos resultados en diversos ambientes y con diferentes alimentos. En el Perú se encuentra en las cuencas bajas de los ríos Napo, Putumayo, Marañón, Pastaza y Ucayali, con abundancia en la Reserva Nacional Pacaya Samiria, es una de las especies más promisorias para el desarrollo del cultivo intensivo de peces en la región amazónica (IIAP, 2006). Con producciones que pueden llegar a 8,000/kg/ha/año habita en lagos y ríos con temperaturas entre 24 y 31°C (Chu-Koo, 2006), gran rusticidad al manipuleo, respiración aérea (Fontenele, 1953; 1955) y soportan altas densidades, condiciones que pueden facilitar su crianza en sistemas intensivos (Cavero, 2002). Considerado el pez amazónico con la mejor carne; también se aprovechan las escamas, para artesanías, y la lengua en Brasil para preparar el guaraná. El Paiche tiene gran potencial para la piscicultura en la Amazonia, donde se ha desarrollado la tecnología necesaria (IIAP, 2000).

La ausencia de una oferta exportable de esta especie hace absolutamente necesario la implementación de mayores recursos humanos y económicos para investigación, de modo tal, que se logre superar los cuellos de botella actuales tales como la sanidad y la nutrición que limitan las tecnologías de producción de esta promisoriosa especie de la acuicultura amazónica (Del Risco, 2008); sin embargo, dentro de la problemática de la producción de esta especie se considera importante las enfermedades causadas por bacilos Gramnegativos, lo cual es importante las medidas de control y prevención.

Los peces llevan a cabo todo su ciclo de vida en el agua, lo que permite un contacto íntimo con una variedad de microbiota, incluyendo bacterias patógenas y oportunistas, que pueden colonizar la superficie externa e interna de éstos (Austin & Austin, 1987). Las condiciones de sanidad en los peces son alteradas por variaciones ambientales tales como la temperatura, el pH, la concentración de oxígeno disuelto, o varios contaminantes (Rodsæther et al., 1977; Wedemeyer & Goodyear, 1984).

Los peces dulceacuícolas, tanto en condiciones naturales como de cultivo, son susceptibles al ataque e invasión de agentes virales, bacterianos, micóticos y parasitarios, conocidos como patógenos facultativos, que ingresan a las instalaciones de cultivo, conviviendo con los peces sin ocasionarles daño—sin presentar manifestaciones clínicas de la enfermedad; sin embargo si las condiciones se tornan desfavorables para los peces, pueden bajar sus defensas naturales y el microorganismo invade al hospedero, comportándose como un patógeno y ocasionando altas tasas de mortalidades en las piscifactorías (Centeno & Silva, 2004).

En el cultivo de peces, la explotación intensiva permite el manejo de altas densidades de organismos por unidad de área; en efecto , este tipo de gestión con frecuencia conduce a niveles elevados de estrés, lo cual afecta su estado inmunológico propiciando una mayor proliferación de bacterias oportunistas que causan enfermedades y con manifestaciones que van desde el crecimiento lento, reducción de las tasas de fecundidad, hasta la aparición de graves epidemias teniendo como resultado una alta mortalidad (Thatcher,1991; Pavanelli *et al*, 1998). Estas bacterias constituyen una fuente potencial de infección para el hombre, produciendo patologías como: gastroenteritis, diarreas espontáneas e infecciones extraintestinales (Joklik *et al.*, 1998). Como resultado de estos estudios se han aislado bacterias de importancia sanitaria, tanto para especies ícticas como para la salud pública, resaltando bacilos Gramnegativos móviles, ampliamente distribuidos en ambientes acuáticos, suelo, agua y plancton (Álvarez & Agurto, 2000). Razón por la cual, el cultivo intensivo de peces merece una atención especial que representa: altas inversiones y elevadas densidades de cultivo, que exigen manejo y monitoreo constante de los parámetros relacionados con el cultivo, proporcionando condiciones necesarias para el mejor crecimiento de los peces (Henostroza, 2010).

Dentro de las bacterias Gramnegativas, los fermentadores oxidasa-positivos, particularmente especies de *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Vibrio*, *Salmonella*, *Shigella* y *Campylobacter*, se describen como los principales patógenos entéricos; sin embargo, el surgimiento de varias especies nuevas de *Campylobacter* y *Vibrio* con manifestaciones clínicas proteiformes hace necesario que se tomen en cuenta como causas potenciales de enfermedades extraintestinales (Koneman *et al.*, 1992).

Los antibióticos son compuestos relativamente sencillos producidos por bacterias u hongos que atacan específicamente a las bacterias e interfieren en algún paso del metabolismo donde encuentran un blanco adecuado. Desde el descubrimiento de la penicilina, se han establecido docenas de nuevos tipos de antibióticos y optimizado o sintetizado cerca de una centena (Sánchez, 2006). Un fármaco que perturba una función microbiana que no existe en células eucariotas animales va a tener una toxicidad selectiva mayor y un índice terapéutico mayor.

Los mayores problemas económicos en el cultivo de especies tropicales están asociados con bacterias que forman parte de la microbiota de los peces, que en ocasiones pueden actuar como patógenos oportunistas dependiendo de la calidad del agua de cultivo y provocando altas tasas de mortalidad de hasta el 70% del cultivo en un mes con pérdidas económicas de hasta 251,392.00 nuevos soles al año aproximadamente. Ante la problemática de empresas dedicadas al cultivo de *A. gigas*, se han tomado muchas medidas para mitigar las pérdidas económicas por mortalidad durante los primeros meses de cultivo de los alevines de dicha especie, ante la ausencia de métodos efectivos en el control de las enfermedades en torno a la utilización de antimicrobianos como una práctica rutinaria y debido a que no se han reportado estudios sobre la identificación de bacilos Gramnegativos en alevines *A. gigas* presente en la primera etapa del proceso productivo, que comprende el primer mes de vida, y que estén asociados a altas mortalidades, es que se decide realizar el estudio del mismo para especificar las bacterias patógenas y la sensibilidad de las mismas a diferentes agentes antimicrobianos y de esta manera contribuir de forma significativa a la mejora del cultivo intensivo de la mencionada especie elaborando el protocolo de buenas prácticas de manejo, teniendo en cuenta el cuidado de la calidad del agua, el almacenamiento de los alimentos balanceados y los medicamentos específicos, para cada tipo de patógeno, a utilizar durante algún evento de bacteriosis.

Por lo antes expuesto, se planteó el problema: ¿Cuáles serán los resultados de la identificación bioquímica y susceptibilidad antimicrobiana de los bacilos Gramnegativos presentes en la primera etapa del proceso productivo en hatchery de alevines de *Arapaima gigas* “Paiche” en Pucallpa – Ucayali, Perú?

El objetivo general fue identificar bioquímicamente y evaluar la susceptibilidad antimicrobiana de los bacilos Gramnegativos presentes en la primera etapa del proceso productivo en hatchery de alevines de *Arapaima gigas* "Paiche" en Pucallpa – Ucayali, Perú y los objetivos específicos fueron los siguientes:

- Aislar e identificar cuantitativa, cualitativa y bioquímicamente los bacilos Gramnegativos de alevines de *A. gigas* presente en la primera etapa del proceso productivo en hatchery en Pucallpa – Ucayali, Perú.
- Aislar e identificar cuantitativa, cualitativa y bioquímicamente los bacilos Gramnegativos en agua y alimento presente en la primera etapa del proceso productivo en hatchery de alevines de *A. gigas* en Pucallpa – Ucayali, Perú.
- Determinar e interpretar la susceptibilidad antimicrobiana de los bacilos Gramnegativos patógenos presente en la primera etapa del proceso productivo en hatchery de alevines de *A. gigas* en Pucallpa – Ucayali, Perú.

## II. MATERIALES Y METODOS

### 2.1. Localización del área de trabajo

El trabajo de tesis se realizó en las instalaciones de Laboratorios Natura Analítica S.A.C localizada en el Distrito de Callería, Provincia de Coronel Portillo, Departamento de Ucayali – Perú; de Agosto a Diciembre del 2016 (Figura 1).

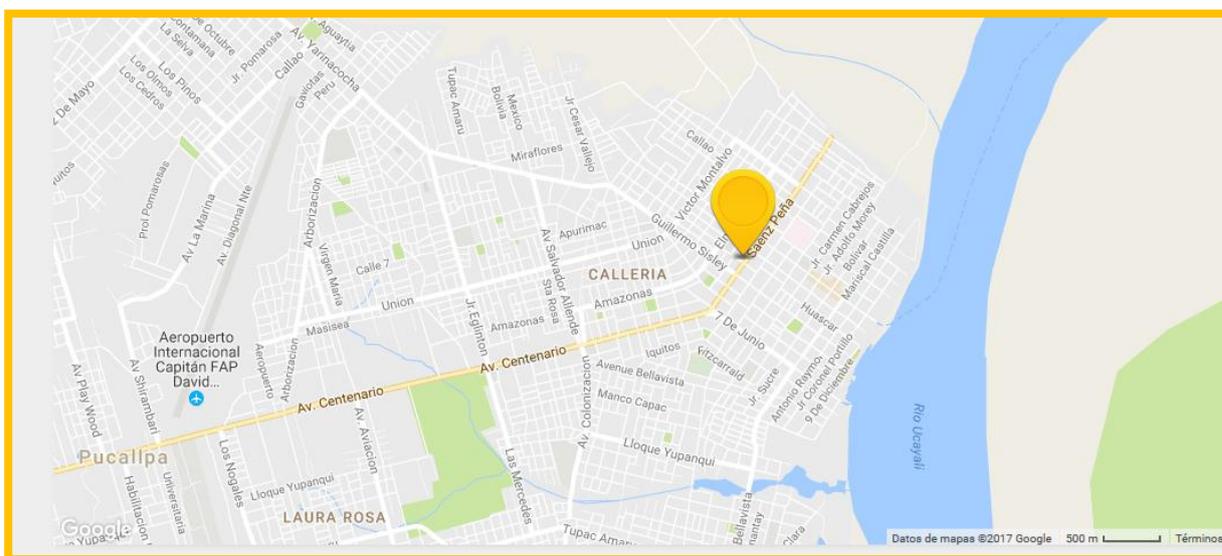


Figura 1. Localización de Laboratorios Natura Analítica S.A.C en Pucallpa - Ucayali, Perú.

### 2.2. Obtención, transporte del material biológico

#### - Alevines de *A. gigas*:

Se obtuvieron 100 alevines con ciertas manifestaciones clínicas de posibles enfermedades bacterianas, de  $4.0 \pm 0.5$  cm con  $0.3 \pm 0.05$  g de los estanques de reproducción de la estación piscícola INVERSIONES CAMPOVERDE S.A.C en el Km 12 de la Carretera Tournavista Distrito de Campo Verde, Provincia de Ucayali, Perú.

Los alevines de *A. gigas* fueron trasladados al hatchery, ubicado en el Km 10 de la Carretera Federico Basadre, en baldes de 20 L de capacidad con bolsas de polipropileno conteniendo oxígeno disuelto y posteriormente fueron puestos en cuarentena durante 24 horas sin alimentación y con baños profilácticos con sal a 5 g/L por espacio de 30 minutos cada 8 horas.

- **Siembra y acondicionamiento del material biológico**

Los alevines de paiche fueron sembrados en tanques de fibra de vidrio previamente desinfectados; a una densidad inicial de 16 peces/ L en sistema de circulación continua.

Se obtuvo agua del pozo tubular con una electrobomba, almacenada en un tanque de concreto y distribuida a los tanques de cultivo utilizando una bomba de agua.

El ingreso de agua a cada unidad de cultivo, fue con un caudal específico para la primera etapa de cultivo con el que se mantuvo los parámetros fisicoquímicos del agua requeridos para el cultivo de alevines de *A. gigas*.

- **Obtención del alimento utilizado:**

Los nauplios de *Artemia* se obtuvieron por medio de la decapsulación, con hipoclorito de sodio al 5% cloro activo, de cistos de *Artemia salina* de la marca *Mackay Marine Brine Shrimp* provenientes del Great Salt Lake previamente hidratados.

Se utilizó un alimento comercial extrusado de la marca Naltech con 55% Proteína mínima y de 0.3 mm de diámetro.

Antes y durante la experiencia los alevines fueron alimentados durante las primeras dos semanas de cultivo se les proporcionó nauplios de *Artemia* con frecuencia de alimentación de cada una hora y luego se realizó la transición al alimento balanceado de 55 % proteína mínima.

- **Calidad de agua:**

Se registraron datos de temperatura del agua de cultivo y del ambiente con un termómetro digital -4 a 50°C; también se midieron los parámetros químicos como el oxígeno disuelto utilizando un Oxímetro YSI 55 y para las mediciones de pH, amonio, nitrito, nitrato se midieron con el kit de coloración LaMotte.

Los datos de temperatura fueron tomados durante la primera etapa del cultivo a cada hora y los parámetros químicos del agua se tomaron una vez por semana y antes de cada muestreo para los análisis bacteriológicos.

### **2.3. Preparación de las muestras para el análisis bacteriológico**

#### **- Recuento de bacterias Gramnegativas**

Se utilizaron alevines de *A. gigas* de un mes de edad con 3.5 cm de longitud y con 0.25 g de peso promedio. Se utilizaron 30 peces en total, 10 peces *in toto* por cada muestreo para formar una sola muestra (Conroy & Conroy, 1987). Los peces fueron desinfectados externamente con alcohol 70° por espacio de un minuto aproximadamente y enjuagados con agua destilada estéril antes de proceder a triturarlos en un mortero con pilón de porcelana debidamente esterilizados y se le agregó 13.5 mL de solución salina fisiológica al 0.9% estéril. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas desde  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$  de las cuales se tomó 0.1 mL para siembra en superficie por duplicado en Medio MacConkey a 37°C por 24 horas

Se trabajó con 5 g de nauplios de *Artemia* recién eclosionados que fueron enjuagados con agua destilada estéril para después triturarlos en un mortero con pilón de porcelana debidamente esterilizados y se le agregó 45 mL de solución salina fisiológica al 0.9% estéril. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas desde  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$  de las cuales se tomó 0.1 mL para siembra por duplicado en superficie en Medio MacConkey a 37°C por 24 horas.

De la muestra de alimento extrusado se utilizaron 5 g del mismo obtenidos directamente de la bolsa sellada, inicialmente se evaluó su calidad determinando el porcentaje de finos, tiempo de hundimiento, olor y textura. Para esta muestra se estableció una sola dilución,  $10^{-1}$  para siembra por duplicado en superficie en Medio MacConkey a 37°C por 24 horas, por tratarse de un producto comercial recién adquirido del proveedor; se agregaron 45 mL de solución salina fisiológica al 0.9% estéril y se procedió a triturar el alimento en un mortero con pilón de porcelana debidamente esterilizados.

Se tomaron 100 mL de las muestras de agua del pozo de almacenamiento y de las unidades de cultivo, en envases de vidrio previamente esterilizados, y de ambas muestras de agua se trabajó con una sola dilución de  $10^{-1}$  para realizar la siembra en superficie por duplicado de 0.1 mL de cada muestra en Medio MacConkey a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 horas.

El conteo de las UFC de cada muestra se realizó manualmente con ayuda de un marcador indeleble y una lupa (Figura 2).

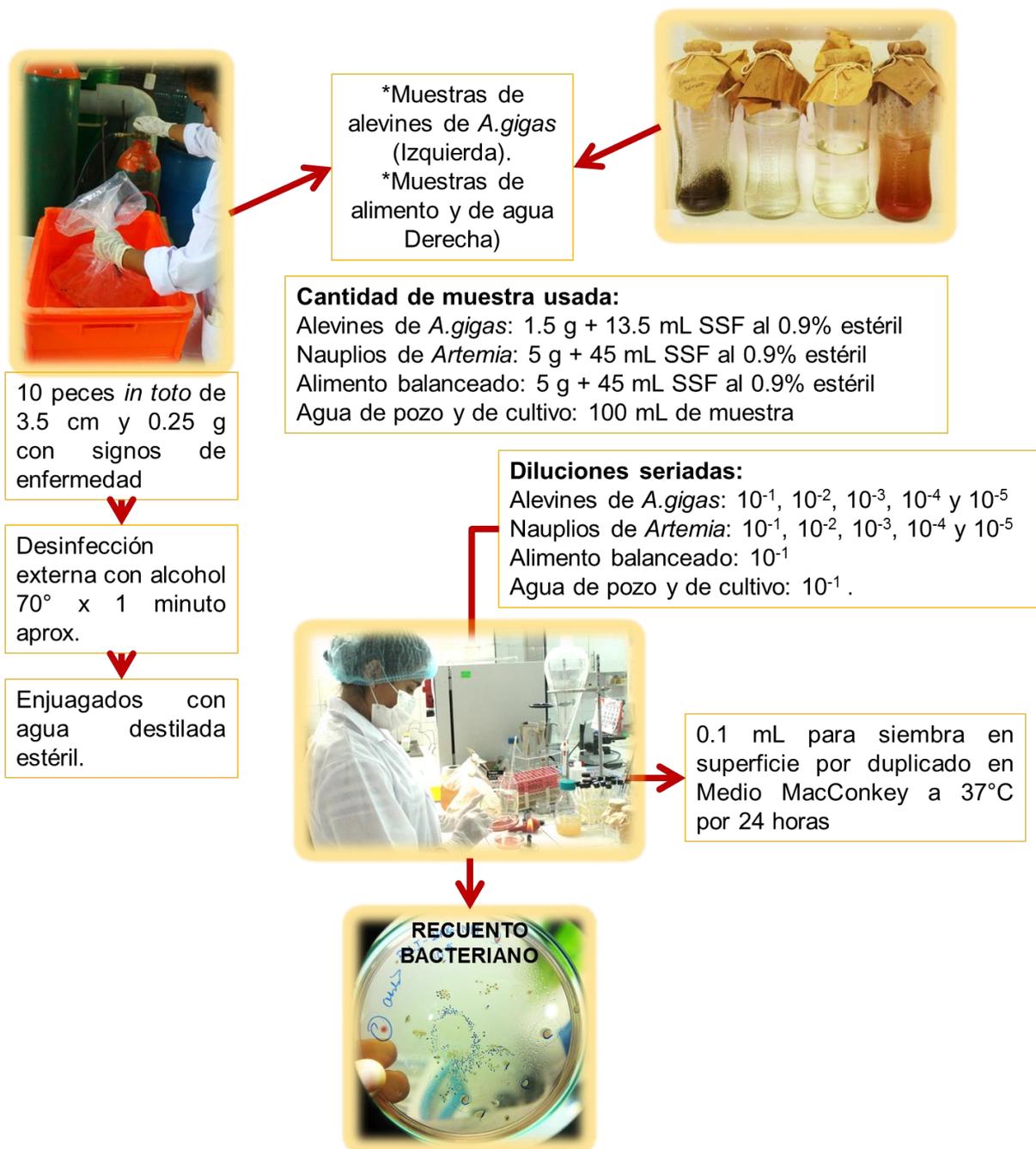


Figura 2. Flujoograma de la preparación de las muestras para la realización del recuento bacteriano

## 2.4. Aislamiento y obtención de colonias puras

De las colonias encontradas en los recuentos bacterianos de cada muestra; se procedió a aislar las colonias de características diferentes, en tubos de ensayo con medio TSA, con una inclinación de 45° aproximadamente, para obtener los cultivos puros y después de 24 horas a 37°C se siguió con la identificación bioquímica mediante sistema miniaturizado API 20E (Figura 3).



Figura 3. Aislamiento y siembra de cultivos puros en tubos de ensayo con medio TSA

## 2.5. Identificación de bacilos Gram negativos con sistema API 20E

Cada batería API 20E contiene 20 micro tubos con sustratos deshidratados para *Enterobacteriaceae* y otros bacilos Gramnegativos no exigentes. De los cultivos puros obtenidos, se cogieron dos asadas para crear el inóculo en agua destilada estéril para posteriormente colocarlo en los micro tubos (Figura 4). Después de 24 horas de incubación a 37°C, se observó el cambio de coloración para la adición de los reactivos correspondientes. La lectura de los resultados se realizó mediante el Software API WEB.



Figura 4. a) Cultivos puros en medio TSA. b) Siembra de cultivo puro en galería API 20E

## 2.6. Susceptibilidad antimicrobiana

Se realizó la prueba de susceptibilidad antimicrobiana a las bacterias identificadas; se sembró en placas Petri con medio Muller Hinton por 24 horas a 37°C y para poder observar los halos de inhibición se utilizaron multidiscos para bacterias gramnegativas (Figura 5) (Anexo 2).

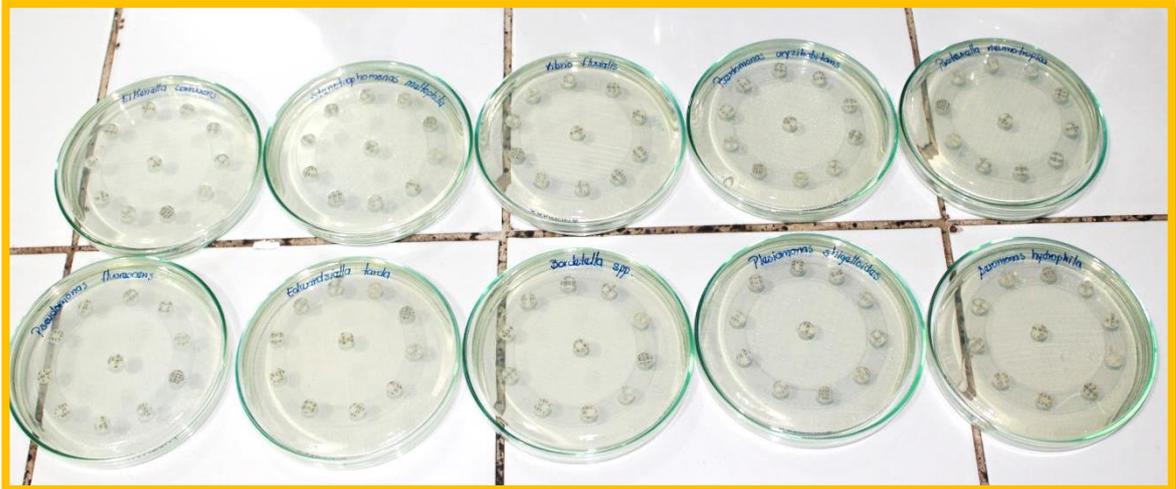


Figura 5. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana de los cultivos puros en medio Muller Hinton (Sacsquispe & Velásquez, 2002).

## 2.7. Análisis estadístico:

Los datos de recuento bacteriológicos de las muestras de alimento, del agua y de los alevines de *A. gigas*, así como también a los halos de inhibición antimicrobiana, fueron sometidos a medidas de tendencia central y se aplicará ANOVA y comparaciones de medidas mediante la prueba Duncan, con un nivel de significancia del 5%. Se empleó el paquete estadístico SPSS versión 18 para Windows.

### III. RESULTADOS

Durante la toma de muestra, los parámetros fisicoquímicos del agua del cultivo de *A. gigas*, se mantuvieron en un promedio semanal de 26°C, con oxígeno disuelto de 3.4 mg/L, 7.8 unidades de pH; así como, los nitritos y nitratos promedios se mantuvieron en las unidades mínimas de 0 y 10 mg/ L respectivamente, tal como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Valores promedios de los parámetros físico químicos del agua de cultivo de *A. gigas* "Paiche" durante la primera etapa de su cultivo en hatchery en Pucallpa, Ucayali - Perú

FECHA	PARAMETROS FISICO		PARAMETROS QUIMICOS			
	Temperatura (°C)	Oxigeno (mg/ L)	Amonio (mg/ L)	Nitrito (mg/ L)	Nitrato (mg/ L)	pH
SEMANA 1	26	3.54	0	0.25	10	7.6
SEMANA 2	25.8	3.29	0	0.25	10	7.6
SEMANA 3	26.2	3.5	0	0	10	8
SEMANA 4	26.2	3.45	0	0	10	8

Las manifestaciones anatomopatológicas macroscópicas externos de los alevines de *A. gigas* analizados fueron hinchazón abdominal y cambio en la coloración de la piel sugiriendo la posible presencia de bacterias en el tracto digestivo, mientras que en los análisis microscópicos externos se descartó presencia de parásitos en branquias y en piel (Figura 6).

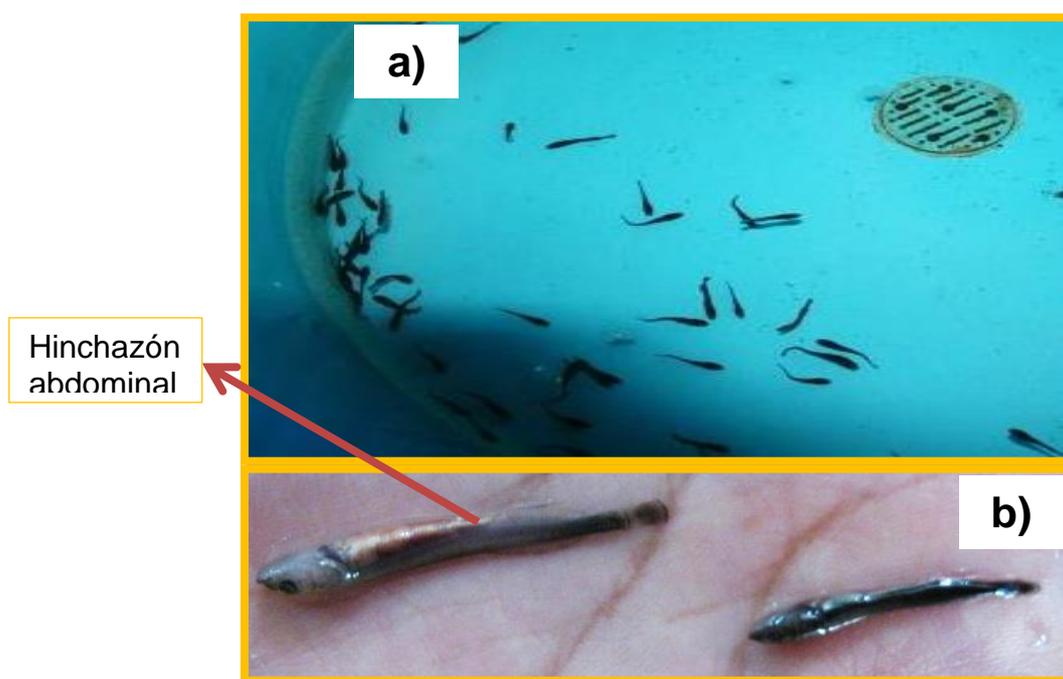


Figura 6. a) Alevines de *A. gigas* con evidencia de natación aletargada. b) Cambio en la coloración de la piel e hinchazón abdominal.

Con el uso de los perfiles numéricos del sistema de identificación bioquímica de *Enterobacteriaceae* y otros bacilos Gramnegativos no exigentes API 20E, se identificaron 10 bacilos Gramnegativos con porcentajes de identificación que variaron desde 38.7% indicando una identificación con baja discriminación para el caso de *Bordetella sp.*, hasta el 99.9 % en el caso de *Plesiomonas shigelloides* indicando una muy buena identificación de bacilos Gramnegativos presentes en la primera etapa del proceso productivo en hatchery de alevines de *A. gigas* (Tabla 2 y 3) (Anexo 3 y 4).

Tabla 2. Identificación de bacilos Gramnegativos, con API20E, presentes en la primera etapa del proceso productivo en hatchery de alevines de *A. gigas* en Pucallpa – Ucayali, Perú.

PERFIL NUMERICO	BACTERIA	% DE IDENTIFICACION	OBSERVACION API
7247124	<i>Aeromonas hydrophila</i>	98.8	Buena identificación
0200004	<i>Bordetella</i>	38.7	Baja discriminación
4344000	<i>Edwardsiella tarda</i>	99.3	Muy buena identificación
0100004	<i>Eikenella corrodens</i>	92	Buena identificación
7144004	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	99.9	Muy buena identificación
2205004	<i>Pseudomonas fluorescens/putida</i>	90.7	Muy buena identificación en el género
0005000	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	50.3	Baja discriminación
1044000	<i>Pasteurella neumatropica</i>	58.5	Baja discriminación
0202000	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	80.4	Identificación aceptable
3204104	<i>Vibrio fluvialis</i>	47.9	Baja discriminación

Tabla 3. Identificación bioquímica con sistema API 20E de bacilos Gramnegativos presentes en la primera etapa del proceso productivo en hatchery de alevines de *A. gigas* en Pucallpa – Ucayali, Perú.

BACTERIA	% DE IDENTIFICACION	OBSERVACION API	PRUEBAS BIOQUIMICAS																				
			ONP	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX
<i>Aeromonas hydrophila</i>	98.8	Buena identificación	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>Bordetella</i>	38.7	Baja discriminación	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Edwardsiella tarda</i>	99.3	Muy buena identificación	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Eikenella corrodens</i>	92	Buena identificación	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	99.9	Muy buena identificación	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Pseudomonas fluorescens/putida</i>	90.7	Muy buena identificación en el género	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	50.3	Baja discriminación	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pasteurella neumatropica</i>	58.5	Baja discriminación	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	80.4	Identificación aceptable	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Vibrio fluvialis</i>	47.9	Baja discriminación	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+

ONP: 2-nitrofenil-βD-galactopiranosida, ADH: L-arginina, LDC: L-lisina, ODC: L-ornitina, CIT: Citrato trisódico, H2S: Tiosulfato de sodio, URE: Urea, TDA: L-triptófano, IND: L-triptófano, VP: Piruvato de sodio, GEL: Gelatina (origen bovino), GLU: D-glucosa, MAN: D-manitol, INO: Inositol, SOR: D-sorbitol, RHA: L-ramnosa, SAC: D-sacarosa, MEL: D-melibiosa, AMY: Amigdalina, ARA: L-arabinosa, OX: Test de oxidasa

En la Tabla 4, se presentan los bacilos Gramnegativos identificados en las diferentes muestras de agua, de alimento y de alevines de *A. gigas* respectivamente; del que se observa que en la muestra de alimento inerte, no se evidenció ningún tipo de crecimiento bacteriano a diferencia del resto.

De las especies identificadas, *Aeromonas hydrophila* se encontró en cuatro de las cinco muestras analizadas.

Tabla 4. Bacilos Gramnegativos presentes en agua, alimento y alevines de *A. gigas* en Pucallpa – Ucayali, Perú.

BACTERIA	AGUA		ALIMENTO		ALEVINES
	POZO	CULTIVO	VIVO	INERTE	
<i>Aeromonas hydrophila</i>	x	x	X	-	X
<i>Bordetella</i>	-	-	X	-	-
<i>Edwardsiella tarda</i>	x	-	-	-	-
<i>Eikenella corrodens</i>	-	-	X	-	-
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	-	-	-	-	X
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	x	-	-	X
<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	x	-	-	-	-
<i>Pasteurella neumotrophica</i>	-	x	-	-	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	x	-	-	-	-
<i>Vibrio fluvialis</i>	-	-	X	-	-

En cuanto a los recuentos bacterianos realizados con las muestras de alimento (vivo, inerte), alevines de *A. gigas* y de las muestras de agua; se tiene que en el primer muestreo, tanto en agua de pozo como en el alimento balanceado, los recuentos bacterianos fueron menores de 1UFC/mL a diferencia de los recuentos de las muestras de nauplios de *Artemia*, alevines de *A. gigas* y del agua de cultivo; así mismo, en el segundo muestreo se evidenció un aumento en UFC/mL en los recuentos bacterianos de agua de pozo, agua de cultivo, nauplios de *Artemia* y alevines de *A. gigas* pero no en la muestra de alimento balanceado en la que no hubo crecimiento bacteriano en ninguna de las réplicas. (Figura 7) (Tabla 5).

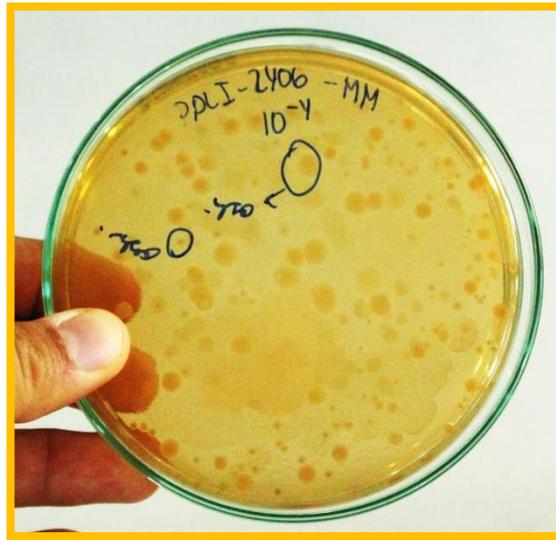


Figura 7. Crecimiento bacteriano en medio Muller Hinton de la muestra de agua de cultivo en el primer y segundo muestreo.

Tabla 5. Recuento de bacilos Gramnegativos presentes en agua, alimento y alevines en la primera etapa del proceso productivo en hatchery de alevines de *A. gigas* en Pucallpa – Ucayali, Perú.

MUESTRA	CEPAS AISLADAS	PRIMER MUESTREO		SEGUNDO MUESTREO	
		RECuento POR CEPA	RECuento TOTAL	RECuento POR CEPA	RECuento TOTAL
		UFC/mL		UFC/mL	
AGUA POZO	<i>Aeromonas hydrophila</i>			$7,5 \times 10^2$	
	<i>Edwardsiella tarda</i>			$1 \times 10^2$	
	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	< 1	< 1	$2 \times 10^2$	$13 \times 10^2$
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>			$2,5 \times 10^2$	
AGUA CULTIVO	<i>Aeromonas hydrophila</i>	$175 \times 10^2$		$401,5 \times 10^2$	
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	$355 \times 10^2$	$650 \times 10^2$	$695 \times 10^2$	$1400 \times 10^2$
	<i>Pasteurella neutrotrophica</i>	$120 \times 10^2$		$303,5 \times 10^2$	
ALIMENTO BALANCEADO*	-	< 1	< 1	< 1	< 1
NAUPLIOS ARTEMIA	<i>Aeromonas hydrophila</i>	$330 \times 10^4$		$3,5 \times 10^6$	
	<i>Bordetella</i>	$552,5 \times 10^4$	$1134,5 \times 10^4$	$278 \times 10^6$	$441 \times 10^6$
	<i>Eikenella corrodens</i>	$251,5 \times 10^4$		$133 \times 10^6$	
	<i>Vibrio fluvialis</i>	$0,5 \times 10^4$		$26,5 \times 10^6$	
ALEVINOS PAICHE	<i>Aeromonas hydrophila</i>	$120,5 \times 10^4$		$11,5 \times 10^6$	
	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	$271,5 \times 10^4$	$392,5 \times 10^4$	$339 \times 10^6$	$353 \times 10^6$
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	$0,5 \times 10^4$		$2,5 \times 10^6$	

\* NO HUBO CRECIMIENTO BACTERIANO

Los datos obtenidos de los recuentos bacterianos totales, en UFC/mL fueron transformados a base logarítmica para poder establecer si existen diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). De la Tabla 5, se observa que la mayor carga bacteriana se encuentra en el segundo muestreo en los nauplios de *Artemia* y en los alevines de *A. gigas* a diferencia de las cargas bacterianas de las muestras de agua y del alimento balanceado.

Tabla 6. Promedio de los recuentos totales expresados en  $\text{Log}_{10}$  UFC/mL de bacilos Gramnegativos presentes en la primera etapa del proceso productivo en hatchery de alevines de *A. gigas* en Pucallpa – Ucayali, Peru.

FUENTE	$\text{Log}_{10}$ UFC/ mL
Agua de pozo	3,1100 <sup>a</sup>
Agua de cultivo	5,1500 <sup>b</sup>
Nauplios de Artemia	8,5467 <sup>c</sup>
Alevines de Paiche	8,6433 <sup>c</sup>

\*Las letras en superíndice de los valores promedio de los recuentos totales expresados en  $\text{Log}_{10}$  UFC/mL de bacilos Gramnegativos, indican diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) entre los mismos.

Respecto a la susceptibilidad antimicrobiana, existen diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre los bacilos Gramnegativos más sensibles a los antimicrobianos como *E. tarda* y *P. shigelloides* y los menos sensibles como *P. fluorescens* y *S. maltophilia* (Tabla 7 y 8); de igual manera se obtuvo que los antibacterianos más efectivos contra los bacilos Gramnegativos encontrados en la primera etapa del proceso productivo en hatchery de alevines de *A. gigas* fueron Ciprofloxacino y Ceftazidima y el menos efectivo fue Cefalotina (Figura 8) (Tabla 9).



Figura 8. a) Susceptibilidad antimicrobiana de *Edwardsiella tarda*. b) Resistencia de *Stenotrophomonas maltophilia* frente a Cefalotina.

Tabla 7. Susceptibilidad antimicrobiana por discos de difusión de bacilos Gramnegativos presentes en la primera etapa del proceso productivo en hatchery de alevines de *A. gigas* en Pucallpa - Ucayali, Perú.

BACTERIA	DIAMETRO DEL HALO DE INHIBICION																							
	NOR (10 mcg)		SX (25 mcg)		C (30 mcg)		CTX (30 mcg)		AK (30 mcg)		GE (10 mcg)		CIP (5 mcg)		CF (30 mcg)		SAM (10 mcg)		CAZ (30 mcg)		CXM (30 mcg)			
	mm	SENS.	mm	SENS.	Mm	SENS.	mm	SENS.	mm	SENS.	Mm	SENS.	Mm	SENS.	mm	SENS.	mm	SENS.	mm	SENS.	mm	SENS.	mm	SENS.
<i>Aeromonas hydrophila</i>	32	S	24	S	33	S	34	S	23	S	21	S	30	S	26	S	14	I	29	S	29	S		
<i>Bordetella</i>	39	S	17	S	16	I	26	S	33	S	27	S	38	S	-	R	11	R	26	S	10	R		
<i>Edwardsiella tarda</i>	38	S	26	S	39	S	41	S	35	S	32	S	37	S	41	S	34	S	42	S	40	S		
<i>Eikenella corrodens</i>	33	S	21	S	37	S	36	S	22	S	20	S	32	S	14	R	16	S	29	S	17	I		
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	35	S	27	S	29	S	29	S	20	S	19	S	36	S	32	S	22	S	36	S	28	S		
<i>Pseudomonas fluorescen/putida</i>	-	R	15	I	16	I	31	S	33	S	32	S	13	R	-	R	15	S	36	S	16	I		
<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	19	S	18	S	35	S	30	S	30	S	28	S	27	S	26	S	36	S	29	S	29	S		
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	25	S	26	S	30	S	14	I	27	S	25	S	32	S	-	R	10	R	22	S	-	R		
<i>Vibrio fluvialis</i>	38	S	11	I	21	S	25	S	26	S	24	S	35	S	-	R	15	S	27	S	-	R		

-NOR: Norfloxacin, SX: Sulfatrimetoprim, C: Cloranfenicol, CTX: Cefotaxima, AK: Amikacina, GE: Gentamicina, CIP: Ciprofloxacino, CF: Cefalotina,

SAM: Ampicilina/ Sulbactam, CAZ: Ceftazidima, CXM: Cefuroxima i v

-S: Sensible, R: Resistente, I: Intermedio

Tabla 8. Valores de los diámetros de la susceptibilidad antimicrobiana de bacilos Gramnegativos presentes en la primera etapa del proceso productivo en hatchery de alevines de *A. gigas* en Pucallpa – Ucayali, Perú.

<b>BACILOS GRAMNEGATIVOS</b>	<b>(mm) halo</b>
<i>Pseudomonas fluorescen/putida</i>	18,6364 <sup>a</sup>
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	19,0909 <sup>a</sup>
<i>Vibrio fluvialis</i>	20,1515 <sup>b</sup>
<i>Bordetella</i>	21,9394 <sup>c</sup>
<i>Eikenella corrodens</i>	25,0303 <sup>d</sup>
<i>Aeromonas hydrophila</i>	26,6970 <sup>e</sup>
<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	27,8182 <sup>f</sup>
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	28,3636 <sup>f</sup>
<i>Edwardsiella tarda</i>	36,7576 <sup>g</sup>

\*Las letras en superíndice de los valores de los diámetros de la susceptibilidad antimicrobiana de bacilos Gramnegativos, indican diferencia significativa ( $P<0.05$ ) entre los mismos.

Tabla 9. Valores de los diámetros de la acción inhibitoria de los antimicrobianos sobre el crecimiento de bacilos Gramnegativos presentes en la primera etapa del proceso productivo en hatchery de alevines de *A. gigas* en Pucallpa - Ucayali, Perú.

<b>ANTIBIOTICOS</b>	<b>(mm) halo</b>
Cefalotina	15,4074 <sup>a</sup>
Cefuroxima	18,7407 <sup>b</sup>
Ampicilina	19,1111 <sup>b</sup>
Sulfatrimetoprim	20,4444 <sup>c</sup>
Gentamicina	25,2222 <sup>d</sup>
Amikacina	27,5185 <sup>e</sup>
Cloranfenicol	28,3704 <sup>f</sup>
Norfloxacino	28,6667 <sup>f</sup>
Cefotaxima	29,4444 <sup>g</sup>
Ceftazidima	30,5185 <sup>h</sup>
Ciprofloxacino	30,9259 <sup>h</sup>

\*Las letras en superíndice de los valores de la acción inhibitoria de los antimicrobianos sobre el crecimiento de bacilos Gramnegativos, indican diferencia significativa ( $P<0.05$ ) entre los mismos.

#### IV. DISCUSIONES

Los parámetros fisicoquímicos evaluados durante el muestreo, como el oxígeno no resultó ser un limitante en el cultivo de *A. gigas*, ya que y según Franco & Peláez (2007) concluyen que los *Osteoglosidos*, conforman un grupo de peces adaptados a ecosistemas acuáticos pobres en oxígeno, lo cual ha generado adaptaciones excepcionales como la del *A. gigas*, en el cual la vejiga natatoria está transformada en un órgano de respiración, quizás más funcional e importante que las branquias, las cuales están poco desarrolladas. En cuanto a temperatura condiciona la maduración gonadal, el tiempo de incubación de las ovas, el desarrollo larval, la actividad metabólica y el ritmo de crecimiento de larvas, alevinos y adultos de los peces y la temperatura recomendada para el manejo de esta especie debe estar entre 26 y 28°C; de igual forma, en el presente estudio, los parámetros fisicoquímicos del agua del cultivo de *A. gigas*, se mantuvieron en un promedio semanal de 26°C, con oxígeno disuelto de 3.4 mg/ L, 7.8 unidades de pH y en cuanto al nitrito y nitrato medidos, estos se mantuvieron en las unidades mínimas de 0 y 10 mg/ L respectivamente. Lo que indica que el agua de cultivo mantenida en este estudio, estuvieron en los niveles requeridos para el cultivo de *A. gigas* (FAO, 1999)

El análisis anatomopatológico externo que se realizó a los alevines de *A. gigas*, evidenció palidez, nado aletargado, hinchazón abdominal y hemorragias cerca de las aletas anales siendo algunas de las sintomatologías de enfermedades causadas por *A. hydrophila* la cual fue encontrada en cantidades de  $11.5 \times 10^6$  UFC/ mL, de igual manera, Vásquez (2010) realizó un estudio clínico de tilapias híbridas (50 – 70 g) durante la infección experimental con *A. hydrophila* y *E. tarda* con inoculaciones intraperitoneales de  $7 \times 10^8$  UFC/ mL y  $2 \times 10^8$  UFC/ mL, de *A. hydrophila* y *E. tarda* respectivamente. A partir de las 11 horas los peces infectados presentaron: palidez, letargo, boqueo, aumento de la frecuencia opercular y pérdida de eje de nado. Al examen de necropsia, los peces inoculados con las bacterias evidenciaron: hemorragias en la base de las aletas y órganos internos, palidez e hígado moteado, aumento de líquido abdominal y líquido sanguinolento en el intestino, a diferencia de animales control que no presentaron

estas lesiones, este estudio en tilapias híbridas infectadas con *E. tarda* y *A. hydrophila*, mostraron un cuadro clínico compatible con septicemia hemorrágica.

Por otra parte, Ruiz (2012) realizó la evaluación de la microbiota bacteriana presente en el estómago del Lenguado. El aislamiento microbiológico lo realizó de dos formas: La primera, usando el enriquecimiento primario y usando medios selectivos para la propagación de microorganismos del género *Vibrio*, posteriormente realizó las pruebas complementarias que fueron la identificación bioquímica que consistió en distintos test químicos aplicados a los medios biológicos, que permitió identificar los distintos microorganismos presentes.

La segunda forma, se realizó utilizando las galerías de los test rápidos comerciales, Kit API20 NE, para la identificación bioquímica de las bacterias *Vibrio* presente. Para los resultados se utilizó el BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY (1994) y un sistema automatizado para el kit rápido que se obtuvieron con ayuda del programa informático API WEB, que son reportados de acuerdo a los criterios establecidos por los fabricantes. Se identificó 14 cepas microbianas; 12 pertenecen a *Vibrio alginolyticus* y dos presuntivas, 01 perteneciente a *Vibrio parahaemolyticus* y 01 a *Pseudomonas*. De manera similar, para el estudio de los bacilos gramnegativos presentes en la primera etapa del proceso productivo de alevines de *A. gigas*, se utilizó las galerías del test de API 20E para enterobacterias que fueron identificadas mediante el programa APIWEB de donde se reporta la presencia de bacteria pertenecientes a *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Vibrio*, *Bordetella*, *Eikenella*, *Aeromonas*, *Plesiomonas* y *Edwardsiella*.

La identificación de bacilos gramnegativos presentes en la primera etapa del proceso productivo en hatchery de alevines de *A. gigas* se observó la presencia de *P. fluorescens/putida*, *S. maltophilia*, *V. fluvialis*, *Bordetella*, *E. corrodens*, *A. hydrophila*, *P. oryzihabitans*, *P. shigelloides*, *E. tarda*, según se observa en la tabla 1. Por su parte, Serrano *et al.* (2014) evaluaron la presencia de agentes bacterianos en 120 paiches criados sin signos clínicos de enfermedad, que fueron divididos en cuatro grupos etarios (10-30, 31-180, 181-365 y >365 días de edad) de dos centros de cultivo de la Amazonía peruana en el que se reportó la presencia de siete agentes bacterianos *Pseudomonas spp*, *Bacillus spp*, *Staphylococcus spp*, *Streptococcus spp*, *Escherichia spp*, *A. hydrophila* y

*Corynebacterium spp.* llegando a obtener algunos cultivos similares, teniendo en cuenta el método empleado cabe destacar que Serrano utilizó el método de identificación convencional en el que se lograron identificar las bacterias hasta su género, por el contrario, la identificación de bacilos gramnegativos en el presente estudio se realizó con el sistema de identificación miniaturizada API 20E que establece hasta el 99% de confiabilidad en la identificación de género y especie.

En varios de los países latinoamericanos en los cuales se cultivan tilapias y sus híbridos, se han aislado la *A. hydrophila*, *E. tarda*, *P. fluorescens*, *Pseudomonas spp.*, *Vibrio spp.*, y otras especies de aeromonádidos móviles. Es importante señalar que *Vibrio spp.*, ha sido obtenido del contenido intestinal de tilapias aparentemente sanas y en ambientes dulceacuícolas, peces asintomáticos de la infección. Estas bacterias son componentes normales de la microbiota bacteriana de tilapias y de su ambiente acuático, son consideradas patógenos facultativos u oportunistas que ocasionan la enfermedad cuando los peces se someten a estrés (Conroy, 2004); en los alevines de *A. gigas* fueron encontradas las bacterias gramnegativas *A. hydrophila*, *P. shigelloides* y *P. fluorescens* (tabla 3) pudiéndose tratar de la microbiota bacteriana normal presente en el tracto digestivo de los alevines de paiche. De igual manera, Carnevia *et al.* (2010) realizaron un relevamiento de enfermedades bacterianas que afectan peces ornamentales en Uruguay colectando peces visiblemente afectados en comercios y criaderos, caracterizaron los cuadros, pudiéndose reconocer septicemia aguda, ascitis subaguda y ulcerosa crónica; la forma más común fue la aguda septicémica (63,1 % de los casos), la que suele cursar con ectoparasitosis severas y presentar alta mortalidad y las bacterias más comúnmente involucradas fueron *A. hydrophila* y *P. fluorescens*, si bien otros gramnegativos fueron aislados, estas bacterias son potencialmente zoonóticas; así mismo, en el presente estudio no se encontraron ectoparásitos ni en escamas ni en branquias.

En las muestras de agua del pozo, se identificó a *A. hydrophila*, *E. tarda*, *P. oryzihabitans*, *S. maltophilia* de las cuales, *E. tarda* se encuentra en aguas contaminadas con materia orgánica, pudiendo aislarse en ocasiones a partir de orina y heces del hombre y otras especies superiores; se cree que es un componente normal de la microbiota bacteriana intestinal de las serpientes; sus

colonias son de color grisáceo lisas y de aspecto similar a las de otras enterobacterias; causa la enfermedad conocida como septicemia por *Edwardsiella* y al igual que el *Vibrio*, ataca a las anguilas y al bagre, se caracteriza porque los peces presentan cavidades necróticas con gas maloliente en los músculos (Roberts, 1981).

Negrete *et al* (2004) indican que *V. fluvialis* es un patógeno que requiere de un hospedero vivo y que no puede ser transmitido vía el agua de los estanques; es decir, su transmisión se realiza por contacto directo; en conclusión, el comportamiento de *V. fluvialis* debe considerarse patógeno secundario de peces de ornato como *Carassius auratus*. Del presente estudio, se obtuvo *V. fluvialis* de los nauplios de *Artemia* (tabla 3) que son proporcionados a los alevines de *A. gigas* durante los primeros días de su cultivo, razón suficiente para tener las condiciones sanitarias de manejo en estricta vigilancia para evitar su transmisión directa por la alimentación.

Según la norma sanitaria para las actividades pesqueras y acuícolas de la FAO (2017), se dispone que los centros de cultivo deben tener y aplicar un programa de aseguramiento de la calidad sanitaria del producto, dirigido a prevenir y controlar, entre otros la presencia de contaminantes químicos y pesticidas y el suministro adecuado de drogas terapéuticas y aditivos alimentarios. No existe referencia específica sobre las restricciones en el uso de sustancias químicas o drogas o medicamentos en el desarrollo de las actividades acuícolas.

Los antibióticos son compuestos de origen microbiano que matan o inhiben el crecimiento de otros microorganismos. Estos pueden ser sintetizados, creándose una gran variedad de compuestos con distintos métodos de acción, especificidad y toxicidad. En animales, los antimicrobianos son utilizados para el tratamiento o prevención de enfermedades, así como también para promover el crecimiento, en algunos casos. Su elevado uso, sumado a una pobre absorción de estos medicamentos por parte del animal, ha causado que lleguen tanto al medio acuático como al terrestre. El uso de estos químicos favorece la selección de bacterias resistentes y promueve la diseminación de los genes de resistencia, que

podiera eventualmente traspasar nichos ecológicos hasta llegar al ambiente humano (Barattini, 2012).

El tratamiento para la eliminación de bacterias se da con antibióticos específicos para cada género de bacteria o con antibióticos de amplio espectro. Algunos tratamientos utilizados para el control de Bacterias es el Cloranfenicol (2g/ 100 L) dos gramos de cloranfenicol cada 100 litros de agua, Tetraciclina (3g/ 100 L) Tres gramos de tetraciclina cada 100 litros de agua, Enrofloxacina al 10% (1mL / 100 L) Un mililitro de enrofloxacina al 10% cada 100 litros de agua (Franco & Peláez, 2007).

La estrategia más común utilizada actualmente en los centros de cultivo es el tratamiento con antibióticos tales como las tetraciclinas o amoxicilinas a concentraciones de 250 mg/mL en la piscina o de 3 mg/mL para que ingiera el pez, antibióticos de comprobada acción antimicrobiana y de amplio espectro (Toledo *et al.*, 2004). El empleo de sulfonamidas o de la tetraciclina puede reducir el número de bajas, aunque se debe mejorar la higiene, controlar la calidad del agua y reducir la densidad de población (Roberts, 1981). Wittwer (2012), quien estudio la caracterización bacteriana de intestino de salmón del atlántico adulto, especifica que la microbiota digestiva es un factor relevante en la nutrición de los peces es por eso que tomó muestras intestinales provenientes de tres individuos adultos a partir de las cuales se realizaron recuentos bacterianos en placa y aislamiento de cepas. Las cepas intestinales fueron identificadas mediante análisis del gen ADNr 16S y caracterizadas en cuanto a la producción de enzimas, capacidades metabólicas y susceptibilidad a antibióticos. Como resultados, obtuvo un total de 107 bacterias intestinales que fueron aisladas, el género predominante fue *Pseudomonas* spp. Las pruebas de susceptibilidad a antibióticos demostraron alta resistencia a Florfenicol (92%) y a Eritromicina (81%); en el análisis de susceptibilidad antimicrobiana realizado a los bacilos gramnegativos encontrados en la primera etapa del proceso productivo en hatchery de alevines de *A. gigas*, se obtuvo que los antibacterianos más efectivos fueron Ciprofloxacino y Ceftazidima y el menos efectivo fue Cefalotina.

## V. CONCLUSIONES

Los bacilos gramnegativos presentes en la primera etapa del proceso productivo en hatchery de alevines de *A. gigas*, identificados con el sistema de identificación bioquímica API 20E, fueron *A. hydrophila*, *P. shigelloides* y *P. fluorescens* en alevines de *A. gigas*.

Los bacilos gramnegativos presentes en el alimento vivo fueron *A. hydrophila*, *Bordetella*, *E. corrodens* y *V. fluvialis*; en el agua de cultivo se identificaron *A. hydrophila*, *P. fluorescens* y *P. neumatrophica* y en el agua de pozo se identificaron *A. hydrophila*, *E. tarda*, *P. oryzihabitans* y *S. maltophilia*.

Los bacilos gramnegativos más sensibles a los antimicrobianos fueron *E. tarda* y *P. shigelloides* y los menos sensibles fueron *P. fluorescens* y *S. maltophilia*.

Los antibacterianos más efectivos contra los bacilos gramnegativos encontrados en la primera etapa del proceso productivo en hatchery de alevines de *A. gigas* fueron Ciprofloxacino y Ceftazidima y el menos efectivo fue Cefalotina.

## VI. RECOMENDACIONES

Realizar un seguimiento de la microbiota digestiva normal de alevines de *Arapaima gigas* para establecer diferencias con las bacterias encontradas en el presente estudio.

Realizar la identificación bioquímica de los bacilos Gramnegativos presentes en alevines de *Arapaima gigas* antes de ingresar al proceso productivo en hatchery, durante la primera etapa y antes de pasar a la segunda etapa del proceso productivo en hatchery.

Realizar un estudio sobre la prevalencia bacteriana presente en alevines de *A. gigas* durante la primera etapa del proceso productivo en hatchery.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

AUSTIN, B. Y AUSTIN, D. A. 1987. Bacterial Fish Pathogens, Disease in farmed and wild Fish. Ellis Horwood Books, Chichester (UK), Aquaculture Fish support. pp. 13-45

BARATTINI, P. 2012. Antibioticos en Acuicultura. CAPITULO 8. Chile.

BELAUNDE S. Y RETO T. 2014. La acuicultura como oportunidad: La crianza de peces es el negocio del futuro. SEMANA ECONOMICA. Por Perú Económico.10 julio 2014.

CARNEVIA, D., LETAMENDÍA, M., PERRETTA, A., DELGADO, E. 2010. Caracterización de septicemia hemorrágica bacteriana (SHB), diagnosticadas en peces ornamentales de Uruguay.

CAVERO, B.A.S. 2002. Densidade de estocagem de juvenis de pirarucu, *Arapaima gigas* (Cuvier, 1829) em tanques-rede de pequeno volumen. Dissertacao de mestrado, Instituto de pesquisas da Amazonia/Universidade Federal da Amazonia. Manaus, Brasil. 51p.

CENTENO, L.; SILVA, A.; SILVA, R. & PÉREZ, J. 2004. Fauna ectoparasitaria asociada a *Colossomacropomum* y al hibrido de *C. macropomum* y *Piaractusbrachypomus*, cultivados en Venezuela. *ResvistaBioagro* 16 (2): 121 – 126.

CHU-KOO F. 2006. Domesticación y crianza en cautiverio del *Arapaima gigas*; manejo, aspectos reproductivos y nutricionales. Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana. Iquitos – Perú.

CONROY, G. 2004. Importantes enfermedades detectadas en tilapias cultivadas en América Latina. *Panorama Acuícola Magazine*, 6 (9): 20-25.

DEL RISCO, M.; VELÁSQUEZ, J.; SANDOVAL, M.; PADILLA, P.; MORI-PINEDO, L.; CHU-KOO, F. 2008. Efecto de tres niveles de proteína dietaría en el crecimiento de juveniles de paiche, *Arapaima gigas* (Shinz, 1822). *Folia Amazónica*, 17 (1-2): 29 – 37.

FAO, 1999. Manual del cultivo de paiche (*Arapaima gigas*). Tratado de cooperación amazónica.

FAO, 2014. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Oportunidades y desafíos. Roma 2014.

FAO, 2016. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Contribución a la seguridad alimentaria y a la nutrición para todos. Roma. 224 pp.

FAO, 2017. Visión general de la legislación acuícola nacional. Perú.

FONTENELE, O. 1953. Hábitos de sesova do pirarucu *Arapaima gigas* (CUVIER) (PISCES: Isospondyli, Arapaimidae), e evolucao da sua larva. Publicacao N° 153. Departamento Nacional de Obras Contra as Secas – DNOCS. Fortaleza, Ceará, Brasil.

FONTENELE, O. 1955. Contribuicaoaoconhecimento do pirarucu *Arapaima gigas* (CUVIER) emcativerio (*Actinopiterygii*, *Osteoglossidae*), Publicacao N° 166. Departamento Nacional de Obras Contra as Secas – DNOCS. Fortaleza, Ceará, Brasil.

FRANCO R. H.H & PELÁEZ R. M. 2007. Cría y producción de pirarucú en cautiverio, Experiencias en el Piedemonte Caqueteño /; Florencia (Caquetá-Colombia): Universidad de la Amazonia, 2007. 50 p. ISBN No. 978-958-8286-30-3

IIAP 2000. Cultivo y procesamiento de peces nativos: Una propuesta productiva para la amazonia peruana. Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana (IIAP), Iquitos – Perú.

IIAP 2006.Paiche el gigante del amazonas. Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana (IIAP).

JOKLIK, W.; WILLET, H.; AMOS, D.; WILFERT, C.; ZINSSER, N. Bacterias aerobias Gram negativas. Microbiología. 20ma Ed, Buenos Aires: Panamericana. 1234-1236 pp.1998. NEGRETE R. P., ROMERO J. J., ARREDONDO F. J. L. 2004. Capacidad de *Vibrio fluvialis* (LEE,1981) para producir infección en pez dorado *Carassius auratu*, *L.Vet. Mex.* 35 (1) 2004.

PRODUCE. 2011. Panorama de la Acuicultura Mundial, América Latina y el Caribe y en el Perú. Dirección General de Acuicultura.

ROBERTS R. J. 1981. Fish Pathology. Madrid Mundi-Prensa. Xviii. p. 335-351.

RODSAETHER, M. C., OLAFSEN, J. A., RAA, J., MYHRE, K. Y STEEN J. B. 1977. Copper as an initiating factor of vibriosis (*Vibrio anguillarum*) in eel (*Anguilla anguilla*). *J. Fish Biol.* 10: 17-21.

PAVANELLI, G.C.; EIRAS, J.C. & TAKEMOTO, R. M. 2002. Doencas de peixes. Profilaxia, diagnóstico e tratamento. Ed. Universidade Estadual de Maringá. Maringá, Brasil. 264p.

RUIZ C. 2012. Identificación de bacterias del genero *Vibrio*, aislados del tracto digestivo del lenguado *Etropus ectenes*. DELOS Revista Desarrollo Local Sostenible. Grupo Eumed.net y Red Académica Iberoamericana Local Global. Vol 5. N° 14.

SACSAQUISPE C. R. & VELÁSQUEZ P. J. 2002. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de Disco Difusión. Lima: Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud.

SERRANO M. E, CASTRO P. V, QUISPE H. M, CASAS V. G, LEÓN Q. J. 2014. Aislamiento de bacterias y hongos en tejidos de paiche (*Arapaima gigas*) criados

en cautiverio. *Isolation of bacteria and fungi in tissues of paiche (Arapaima gigas) reared in captivity*. Rev Inv Vet Perú 2014; 25(1): 117-122

THATCHER, V. E. 1991. Amazon Fishparasites. Instituto de Pesquisas da Amazonia. Amazoniana, 11 (3-4): 263-571.

VÁSQUEZ P. M. A., RONDÓN B. I. S., RESTREPO B. L. F., ESLAVA M. P. R., 2010. Estudio clínico y hematológico de una infección experimental con *Aeromonas hydrophila* y *Edwardsiella tarda* en tilapia, *Oreochromis sp.* Orinoquia 14.

WEDEMEYER, G. A. Y GOODYEAR, C. P. 1984. Diseases caused by environmental stressors. In: Kinne, O. (ed.) Diseases of Marine Animals, 4. Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg, pp. 424-434.

# **ANEXOS**

Anexo 1. Galería API 20E incluye 20 micro tubos que contienen sustratos deshidratados

TEST	COMPONENTES ACTIVOS
ONP	2-nitrofenil-βD-galactopiranosida
ADH	L-arginina
LDC	L-lisina
ODC	L-ornitina
CIT	Citrato trisodico
H2S	Tiosulfato de sodio
URE	Urea
TDA	L-triptófano
IND	L-triptófano
VP	Piruvato de sódio
GEL	Gelatina (origen bovino)
GLU	D-glucosa
MAN	D-manitol
INO	Inositol
SOR	D-sorbitol
RHA	L-ramnosa
SAC	D-sacarosa
MEL	D-melibiosa
AMY	Amigdalina
ARA	L-arabinosa
OX	Test de oxidasa

Anexo 2. Discos de sensibilidad antimicrobiana para bacterias Gramnegativas

<b>DISCOS DE SENSIBILIDAD</b>	<b>mcg</b>	<b>ABREVIATURA</b>
Amikacina	30	AK
Ampicilina/ Sulbactam	10	SAM
Cefotaxima	30	CTX
Cefalotina	30	CF
Ceftazidima	30	CAZ
Cefuroxima i v	30	CXM
Ciprofloxacino	5	CIP
Cloranfenicol	30	C
Gentamicina	10	GE
Sulfatrimetoprim	25	SX
Norfloxacino	10	NOR

Anexo 3. Identificación al 99.9 % de *Plesiomonas shigelloides* con el sistema API 20E



Anexo 4. Bacterias Gramnegativas identificadas de las muestras de agua, nauplios de Artemia y alevines de paiche, con el sistema API 20E.

AGUA DE POZO



AGUA DE CULTIVO



NAUPLIOS DE ARTEMIA



ALEVINES DE PAICHE

