



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
ESCUELA DE POSGRADO

**EVALUACIÓN DEL ESTADO DE
SALUD Y ACTIVIDAD BACTERICIDA,
Y AGLUTINANTE DE LA TRUCHA
ARCOÍRIS (*Oncorhynchus mykiss*)
COMO BIOINDICADOR DE LA
CONTAMINACIÓN HUMANA EN LA
CUENCA DEL RÍO CHALHUANCA,
APURÍMAC.**

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO EN
SANIDAD ACUÍCOLA

MELÉNDEZ FLORES, KEYRO ALBERTO

LIMA – PERU

2018

ASESOR:

NINO DANTE ARIAS CRUZ, M.V., Dr.med.vet., M.Sc.

DEDICATORIA

Dedico de todo corazón esta investigación a mi prometida Helian por su paciencia y apoyo en la realización del presente, y a mis hermanos Jainor, Ronal y Yury por hacer posible este sueño.

AGRADECIMIENTO

Al Dr. Nino Arias, coordinador del laboratorio de Biología molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UPCH, por su apoyo y su confianza.

A la Dra. Iskra Tuero por su orientación en la realización de las pruebas de ELISA.

Agradezco el apoyo a Cienciactiva del CONCYTEC por el apoyo financiero brindado al programa de Maestría en Sanidad Acuícola de la UPCH (convenio de gestión N° 230-2015 FONDECYT), que permitió la realización del estudio.

FINANCIAMIENTO

Esta investigación fue financiada con un aporte de FONDECYT.

TABLA DE CONTENIDO

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	ANTECEDENTES.....	3
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	8
	Lugar de realización del estudio	8
	Obtención de muestras	9
	Plan de muestreo	10
	Evaluación del estado de salud	11
	Determinación de la condición corporal (Factor K)	12
	Determinación de los niveles plasmáticos de glucosa	12
	Determinación de los parámetros eritrocitarios o hematimétricos.....	13
	Determinación de cortisol plasmático.....	13
	Evaluación de la actividad bactericida y aglutinación bacteriana.....	14
	Análisis de la capacidad o actividad bactericida.....	14
	Análisis de aglutinación bacteriana.....	15
	Evaluación de la calidad de agua del río	15
IV.	RESULTADOS.....	17
	Evaluación del estado de salud o sanitario.....	17
	Evaluación de la respuesta inmunológica de la trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)..	21

Calidad del agua del río Chalhuanca a través de los parámetros
establecidos en el Estándar de Calidad de Agua (categoría III) en el
DS. N° 002-2008-MINAM..23

V. DISCUSIÓN26

VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....43

VII. BIBLIOGRAFÍA45

ANEXO 1. PROTOCOLO DE LA PRUEBA DE ELISA

ANEXO 2. FIGURAS DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

ANEXO 3. TABLAS

ANEXO 4. CORRELACIÓN DE SPEARMAN

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Promedio de las variables estudiadas para el análisis del estado sanitario de la trucha arcoíris (<i>Oncorynchus mykiss</i>) en el río Chalhuanca	19
Tabla 2. Estado de anemia y estrés como indicador de la salud de la trucha arcoíris (<i>Oncorynchus mykiss</i>) en el río Chalhuanca.el estudio.....	20
Tabla 3. Respuesta inmunológica de la trucha arcoíris (<i>Oncorynchus mykiss</i>) en el río Chalhuanca	22
Tabla 4. Parámetros físico químicos y microbiológicos del río Chalhuanca	25

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de área de estudio y sitios de muestreo	9
Figura 2. Esquema de la metodología experimental	11
Figura 3. Factor de condición K para salmónidos	12
Figura 4. Correlación positiva de los niveles de glucosa y cortisol (rho Spearman =0,4) entre las ciudades de Cotaruse, Caraibamba y Chalhuanca (P<0,05).	20
Figura 5. Comportamiento de los parámetros de hematocrito (rho Spearman =0,55) y cortisol (rho Spearman =0,41) a las concentraciones del oxígeno disuelto del agua del río Chalhuanca en cada ciudad (P<0,05).....	21
Figura 6. Relación de afinidad del cortisol (rho Spearman =-0,4), hematocrito (rho Spearman =-0,55) (P<0,05) y actividad bactericida (rho Spearman =0,16) (P>0,05) a la cantidad de coliformes fecales en el agua del río Chalhuanca para cada ciudad.	23
Figura 7. Relación de afinidad de las concentraciones de hemoglobina (rho spearman =-0,12) (P>0,05), oxígeno disuelto (rho spearman =-1) y factor de condición (rho spearman =-0,4) (P<0,05) a la cantidad de coliformes fecales en el agua del río Chalhuanca en las diferentes ciudades.	24

GLOSARIO

Manosa. La manosa es un azúcar simple o monosacárido que se encuentra formando parte de algunos polisacáridos de las plantas (como el manano, el glucomanano, etc.), y en algunas glucoproteínas animales.

Hb (Hemoglobina). Pigmento rojo contenido en los hematíes de la sangre de los vertebrados, cuya función consiste en captar el oxígeno de los alveolos pulmonares y comunicarlo a los tejidos, y en tomar el dióxido de carbono de estos y transportarlo de nuevo a los pulmones para expulsarlo.

Hto (hematocrito). Volumen de glóbulos con relación al total de la sangre; se expresa de manera porcentual.

RBC (Red blood cell). Es un examen de sangre que mide la cantidad de glóbulos rojos.

VCM (Volumen corpuscular medio). Análisis que conforman el hemograma, es decir el más elemental de los diagnósticos que se realizan en la sangre, y que para este caso en concreto, tiene la función esencial de determinar cuál es el tamaño medio de los glóbulos rojos.

HCM (Hemoglobina corpuscular media). Es uno de los estudios que se realiza en la sangre, y el cual tiene el objetivo de determinar el tamaño promedio que tiene la hemoglobina dentro del glóbulo rojo.

CHCM (Concentración de hemoglobina del promedio de eritrocitos). Es una medida de la concentración de hemoglobina en un volumen determinado de glóbulos rojos. Se informa como parte del hemograma completo.

Anemia. Se define ya sea como una cantidad disminuida de glóbulos rojos, o bien una concentración disminuida de hemoglobina en la sangre, o bien un valor de hematocrito más bajo que lo normal

Estrés. Conjunto de alteraciones que se producen en el organismo como respuesta física ante determinados estímulos repetidos, como por ejemplo el frío, el miedo, la alegría, captura, cambio de ambiente, etc.

Microcitosis. Es una condición donde los glóbulos rojos en la sangre son más pequeños que lo normal, midiéndolos por su volumen corpuscular medio.

RESUMEN

La contaminación humana es un tema de suma importancia para la recuperación y deformación de ecosistemas. El río Chalhuanca es un efluente de alto valor biológico y económico donde se ha realizado actividades acuícolas como la siembra de alevines y cosecha de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). Sin embargo, también se ha estado realizando la eliminación de aguas servidas por las ciudades de Cotaruse, Caraibamba y Chalhuanca. En el recorrido del agua de río se observó peces muertos en los últimos 10 años. Por tal se evaluó la relación entre el estado de salud y actividad bactericida, y aglutinante de la trucha arco iris (*O. mykiss*) con la contaminación humana en el río Chalhuanca. El tamaño de muestra obtenido fue de 36 peces, de manera estratificada en tres puntos, según la fórmula de poblaciones desconocidas, a un alto nivel de confianza (0,95) y un error estándar de $\pm 0,10$ y una proporción esperada de 0,90 de peces comprendidos entre 0,8 a 1,39 de conformación corporal. El estado de salud se evaluó a través de los parámetros como el factor de condición, hemoglobina, hematocrito, conteo de glóbulos rojos, volumen corpuscular medio, hemoglobina corpuscular medio, concentración de hemoglobina por el promedio de eritrocitos, glucosa y cortisol. La respuesta inmunológica a través de las pruebas de capacidad bactericida y aglutinación bacteriana frente a la cepa *E. coli* (ATCC 25922). Por último la calidad de agua a través de sus parámetros microbiológicos, físico y químico, según el DS. N° 002-2008-MINAM. Se encontró, que el 77,8% de las truchas presenta anemia microcítica hipocrómica y el 72,2% de peces sugieren sufrir estrés crónico, estos datos presumen alteraciones en la fisiología normal del pez y concuerda con una reducida capacidad bactericida (30,1%) como también la aglutinación bacteriana (\log^2 de título de aglutinación fue 2,01). El análisis de agua refleja alta carga de

coliformes totales y termotolerantes y la concentración de oxígeno disuelto se encuentra al límite del necesario (5mg/dL). En conclusión, la evaluación de las variables hematológicas de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en el río Chalhuanca refleja un estado anémico y presuntamente estrés crónico, para una confirmación categórica sería necesario estudios más profundos.

Palabras clave: *Oncorhynchus mykiss*, inmunología, sanidad, río, Aymaraes.

ABSTRACT

Human pollution is a very important issue for the recovery and deformation of ecosystems. The Chalhuanca River is an effluent of high biological and economic value where aquaculture activities have been carried out, such as the planting of fingerlings and harvesting of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). However, the disposal of sewage has also been carried out in the cities of Cotaruse, Caraibamba and Chalhuanca. In the course of river water dead fish was observed in the last 10 years. For this reason, the relationship between the state of health and bactericidal activity, and binder of rainbow trout (*O. mykiss*) with human contamination in the Chalhuanca River was evaluated. The sample size obtained was 36 fish, stratified in three points, according to the formula of unknown populations, at a high confidence level (0.95) and a standard error of ± 0.10 and an expected proportion of 0,90; of fish comprised between 0.8 to 1.39 of body conformation. The state of health was evaluated through parameters such as condition factor, hemoglobin, hematocrit, red blood cell, mean corpuscular volume, mean corpuscular hemoglobin, hemoglobin concentration by the average of erythrocytes, glucose and cortisol. The immunological response through tests of bactericidal capacity and bacterial agglutination against the *E. coli* strain (ATCC 25922). Finally, the water quality through its microbiological, physical and chemical parameters, according to the DS. N ° 002-2008-MINAM. It was found that 77.8% of trout have hypochromic microcytic anemia and 72.2% of fish suggest chronic stress; these data presume alterations in the normal physiology of the fish and agree with a reduced bactericidal capacity (30.1 %) as well as bacterial agglutination (\log^2 of agglutination titer was 2.01). The water analysis reflects high load of total and

thermotolerant coliforms and the concentration of dissolved oxygen is at the limit of the necessary (5mg / dL). In conclusion, the evaluation of the hematological variables of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in the Chalhuanca river reflects an anemic state and presumably chronic stress, for a categorical confirmation deeper studies would be necessary.

Keywords: *Oncorhynchus mykiss*, immunology, health, river, Aymaraes.

I. INTRODUCCIÓN

Actualmente, la contaminación humana es ampliamente reconocida como una de las amenazas más serias al ecosistema (Vörösmarty *et al*, 2010), estos contaminantes son vertidos a los sistemas acuáticos, donde se consideran sitios adecuados para la eliminación y de reciclaje, sin embargo, la creciente carga de contaminantes y la sobreexplotación de los recursos hídricos reduce significativamente su capacidad de asimilación (Madhusoodhanan *et al*, 2016). Por lo tanto, es esencial comprender y controlar los efectos de los contaminantes, debido a la evidencia científica, que indica una multitud de contaminantes ambientales pueden perjudicar la salud y el estado físico de individuos de diferentes especies (Holmstrup *et al*, 2010). Los peces, que habitan cerca a zonas urbanas y/o

industrializadas generalmente están expuestos a altos niveles de contaminantes humanos desde las primeras etapas de desarrollo hasta adultos (Sindermann, 1980). Esta exposición a los contaminantes (de forma crónica) produce una baja resistencia a enfermedades (Bols *et al.*, 2001) y/o la muerte, conduciendo, aún más, la contaminación en los cuerpos de agua (Rhind, 2012). La inmunosupresión pueda estar generada por enfermedades subyacentes y/o por medicamentos o agentes químicos (Zelikoff, 1993). Se ha demostrado, que la exposición a los contaminantes, altera significativamente la actividad de la lisozima y produce disminución de leucocitos en varios tipos de peces (Hoeger *et al.*, 2005). Sin embargo, la mayoría de estos hallazgos vienen de ensayos, que se realizó en condiciones de laboratorio, utilizando especies de peces comerciales, y al otro lado del hemisferio (Dunier, 1996). Como tal, los conocimientos sobre inmunotoxicidad y los efectos relacionados con la salud ocasionada por la exposición de contaminantes a los peces, que viven en libertad y en condiciones naturales, siguen siendo escasos, especialmente en la sierra del Perú. Este conocimiento es particularmente valioso, debido a la importancia del efluente en la zona, donde se realiza actividades acuícolas como la siembra y también la pesca de *O. mykiss*. Estas truchas son sustento para el aporte de proteína de muchas familias con recursos limitados, en los últimos nueve años se ha observado disminución de la población de peces, encontrándoseles en la orilla del río, lo que generó dudas a la población referente al estado sanitario de la trucha.

II. ANTECEDENTES

La contaminación humana siempre ha estado presente a lo largo de la historia: la naturaleza y distribución de los contaminantes en el medio ambiente ha cambiado durante los tiempos, desde la revolución industrial, que forzó a las personas a concentrarse en ciudades y dio lugar a una mayor contaminación del aire y ríos, con sustancias contaminantes (Moss, 2008), que pueden ser químicas, orgánicas e inorgánicas (metales) (Wendelaar, 1997). El distrito de Chalhuanca está considerado como un importante centro de lavado de oro, que se inició en la época incaica y continuó en la Colonia (Regal, 1946). Hoy, sigue siendo un importante territorio para la “actividad” por la Corporación Internacional “Hochschild Mining plc” (MINEM, 2011). La respuesta fisiológica al estrés por metales pesados, es

parecida a los vertebrados y están guiadas por neurotransmisores como el cortisol (Wendelaar, 1997). Al inicio de un estado de estrés el pez manifiesta cambios conductuales en la adquisición de alimento, el bloqueo de depredadores, la captura de presas, la migración y la preferencia de hábitat, sin embargo, existe cambios no observables, que son estimuladas por la liberación de hormonas, las hormonas del estrés (catecolaminas y cortisol), que son estimuladas por la hormona adrenocorticotropa (Iwama, 1998). El cortisol, un corticosteroide, causa disminución de la ingesta, crecimiento, reproducción y disminuye la respuesta inmune, en tanto las catecolaminas aumentan el gasto cardiaco, flujo sanguíneo, atracción de la hemoglobina al oxígeno y glucosa plasmática (Romero *et al*, 2011), por tal, estas hormonas activan una serie de vías metabólicas, que dan como resultado alteraciones en la química sanguínea. Una de las formas de poder medir el estrés en una respuesta primaria, es por la cantidad de glucosa, que existe en el plasma (>5 mmol/l en salmónidos; Iwama, 1998). Existe referencias sobre alteraciones hematológicas en el pez *Labeo rohita* expuesto bajo estrés de contaminación, en los lagos de Bangalore en la India y se encontró, que las sustancias tóxicas de los lagos perturban la regulación osmótica e iónica, aumentando el gasto físico y por ende la concentración de glucosa, como también, reduce el transporte de oxígeno, debido a la escasez de hemoglobina y glóbulos rojos (Zutshi *et al*, 2010).

En Argentina, se evaluó la exposición de contaminantes humana sobre los afectos a los parámetros inmunológicos como capacidad bactericida, aglutinación bacteriana y parámetros generales relacionados al estrés (hematocrito y factor de condición), en el pez espada (*Sebastes oculatus*), en las estaciones de verano e

invierno, concluyendo, que los peces expuesto a los contaminantes presentan menor competencia bactericida, hematocrito y factor de condición independientemente de la temporada, y un título alto de linfocitos (Sueiro y Palacios, 2016). En la estación de invierno, los peces mostraron una menor competencia bactericida, hematocrito y factor de condición a comparación de los muestreados en verano (Sueiro y Palacios, 2016). Se pudo encontrar un patrón opuesto para la aglutinación bacteriana, lo que explicaría, que la alteración en los parámetros inmunológicos y de estado de salud de los peces marinos, expuestos a la contaminación humana, independientemente de la estación, resulta en una mayor susceptibilidad a la enfermedad, y a su vez a la disminución de la población (Sueiro y Palacios, 2016).

El recuento sanguíneo completo es una herramienta de diagnóstico importante con protocolos de laboratorio y rangos de referencia bien establecidos, que proporcionan una valiosa herramienta para la evaluación sanitaria (Jill, 2010). Sin embargo, la morfología de los componentes celulares como el órgano encargado de la hematopoyesis, denominada cabeza de riñón (parte anterior del riñón), son diferentes a la de los mamíferos (Jill, 2010). La hemoglobina (Hb), en la trucha arco iris es de 6.99 g/dL, el hematocrito (Hto) es de 40.7 %, el VCM es de 294,2 fl, la HCM es 50,05 pg. y la CHCM es de 17.23% (Rodríguez, 1995). El aumento de la concentración de glucosa sanguínea es un indicador de estrés secundario en peces, que son expuestos, debido a su alta concentración como medida de alerta frente a algún peligro o por el mayor esfuerzo, que necesita para realizar sus actividades habituales (Martínez *et al*, 2009) en promedio los niveles de glucosa son de 77 a 118 mg/100 ml (Álvarez, 1997). El factor de condición corporal o valor de K, está

influenciado, además de los contaminantes, por la edad de los peces, el sexo, la estación, la etapa de maduración, la plenitud del intestino, el tipo de alimento consumido, la cantidad de reserva de grasa y el grado de desarrollo (Barnham y Baxter, 1998).

La contaminación humana puede inducir a la proliferación de infecciones, en la cual el sistema de defensa innato de los peces actúa produciendo la muerte de bacterias, a través de componentes inmunes citológicos y serológicos (Keusch *et al.*, 1975; Merchant *et al.*, 2003), como la fagocitosis, que es particularmente importante para la defensa contra las infecciones bacterianas (Harmon, 1998) y una serie de proteínas solubles, como las citoquinas, con un papel importante en la restricción de la infección (Ochsenbein *et al.*, 1999), como también los anticuerpos naturales, que sirven como moléculas de reconocimiento inespecífico y tienen la capacidad de limitar la infección microbiana temprana (Ochsenbein *et al.*, 1999). Otra forma es a través de la cascada enzimática del complemento el cual puede lisar las células diana a través de la formación del complejo de ataque a la membrana (Esser, 1994) o a través de subproductos proteínicos (Nordahl *et al.*, 2004), por ejemplo la lisozima, un componente plasmático, exhibe capacidad bactericida a través de una digestión enzimática de los carbohidratos estructurales de la pared celular (Selsted y Martínez, 1978). Además, aunque generalmente se considera una respuesta inducida, algunas proteínas de fase aguda, tales como una proteína de unión a manosa, pueden ser constitutivamente producidas en concentraciones adecuadamente altas como para fortalecer (a través de la fijación del complemento u opsonización) la capacidad del tejido sanguíneo para lisar bacterias (Selsted y Martínez 1978).

La contaminación de las aguas de los ríos es una perturbación hidromineral, que se refleja en el cambio de pH del agua, oxígeno disuelto, la composición mineral y los niveles de calcio iónico y es inherente al estrés en los peces, porque pueden tener un impacto significativo en su intensidad (Wendelaar, 1997).

III. MATERIALES Y METODOS

Lugar de realización del estudio.

Los animales estudiados fueron las truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) de vida silvestre con un tamaño comprendido entre 137 y 206 mm de longitud total y 30 a 110 g de peso, indistintamente del sexo y de conformación corporal entre aceptable y pobre (ya que marca un punto medio en el estado nutricional). El estudio se realizó en el distrito de Chalhuanca a lo largo del río, que lleva el mismo nombre (Chalhuanca) en la provincia de Aymaraes, del departamento de Apurímac, este río fluye en transición de montaña y llanura, y es afectado por varias aguas residuales de las ciudades de Cotaruse, Caraibamba y Chalhuanca. Las coordenadas de los

sitios de muestreo son Sitio 1 (S1) 14° 25' 54'', Sitio 2 (S2) 14° 21' 38'', Sitio 3 (S3) 14° 21' 36''. S1 (Cotaruse) fue elegido porque se encuentra antes de las tres ciudades, que depositan sus residuos al río. "S2" está pasando las dos ciudades de Cotaruse y Caraibamba y "S3" está al finalizar la ciudad de Chalhuanca y donde la población creció más a diferencia de las otras (figura 1).

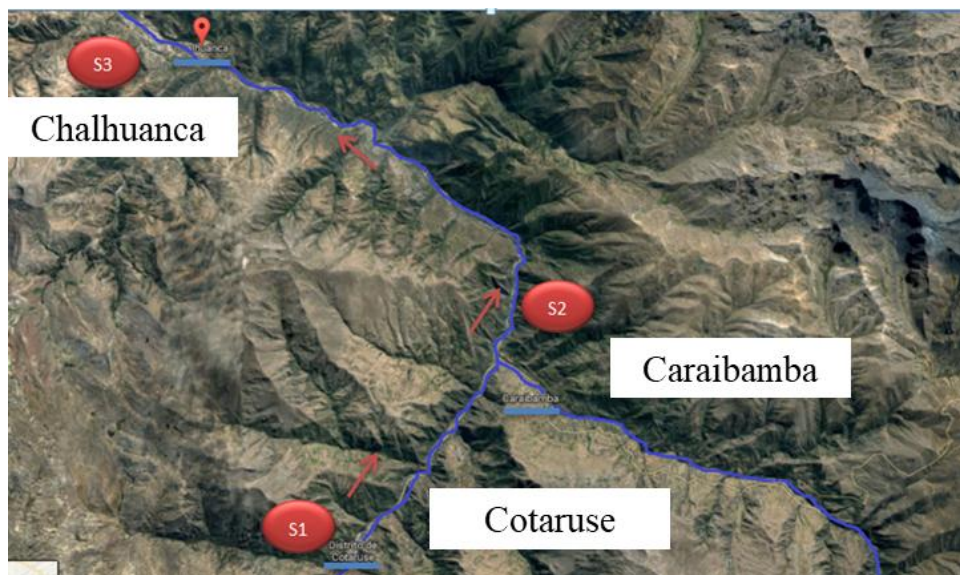


Figura 1. Mapa del área de estudio y sitios de muestreo (Google Inc. S.f)

Obtención de muestras.

Según la fórmula de poblaciones desconocidas, a un alto nivel de confianza (0,95) y un error estándar de $\pm 0,10$ y una proporción esperada de 0,90 (peces de 0,8 a 1,39 de conformación corporal), el tamaño de muestra fue de 36 peces, que se dividieron en tres puntos de manera estratificada. La investigación se realizó en el periodo comprendido en los meses de marzo y abril (después de las lluvias). Los peces fueron capturados con ayuda de una red de pesca, de 4 kg (por cada lance de la red se capturó un pez). Se evitó pasar por el proceso de anestesia, debido a los cambios en el hematocrito, que ocurre con estas sustancias (Iwama, 1998; Örü̇m y Erdemil, 2002). Sin embargo, el proceso de captura y la toma de muestra, se realizó con un

límite máximo de 3 minutos, debido a la ausencia de alteraciones en las constantes hematológicas (Abreu *et al.*, 2009).

La recolección de sangre fue por punción de la vena caudal con aguja 22 G (con ayuda de un asistente); y almacenada en un tubo vacutainer con EDTA. Las muestras se mantuvieron a 4 °C durante un lapso menor a 4 h (Damon *et al.*, 2010). En el laboratorio, el plasma se separó por centrifugación (1500 g durante 5 min) y se almacenó congeladas (primero a -12 y luego a -80 °C).

Plan de muestreo.

El esquema de la metodología experimental (Figura 2). Explica el plan de muestreo. Este plan se inició con la elección de las zonas de muestreo. Paralelamente se capturó a la trucha arcoíris y se tomó muestras de agua, desde las ocho hasta las diez horas del día, desde las áreas río abajo hasta las áreas río arriba con la finalidad de evitar duplicidad de muestras. Luego, se tomó la muestra sanguínea por punción de la vena caudal en tubos vacutainer y se trasladó al laboratorio del Hospital de Chalhuanca. En el laboratorio, se realizó las pruebas hematológicas necesarias y se precedió a obtener el plasma por centrifugación. El plasma fue necesario para realizar las pruebas de glucosa y cortisol, que fueron necesarios para evaluar el estado de salud de las truchas. También fue necesario el plasma, para realizar las pruebas de actividad bactericida y aglutinación bacteriana (pruebas inmunológicas), y una cepa de *E. coli* (ATCC 25922). Sobre la calidad del agua, se tomaron muestras en envases de vidrio y luego fueron entregados al laboratorio de la Dirección de saneamiento ambiental de la Diresa- Apurímac,

para su análisis microbiológico. El análisis fisicoquímico se realizó *in situ*, con ayuda de un equipo multiparámetro de la marca Hanna (Hi 9829).

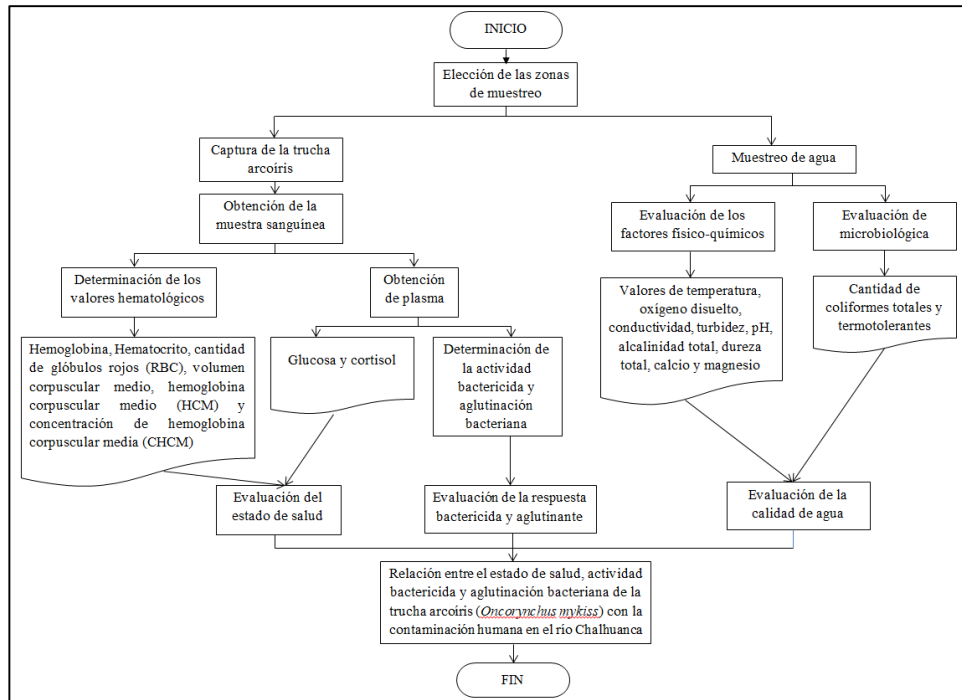


Figura 2. Esquema de la metodología experimental.

Evaluación del estado de salud.

La evaluación del estado de salud o sanitario de la trucha arcoiris se realizó a través de los parámetros como hematocrito (%), hemoglobina (g/dL), volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina corpuscular medio (HCM), concentración corpuscular medio de hemoglobina (CHCM), índice de masa corporal, glucosa (mmol/L) y niveles plasmáticos de cortisol (ng/ml), demostrando estos datos como reflejo de la salud del pez (Sueiro y Palacios, 2016; Zorriehzahra *et al.*, 2010; Valenzuela *et al.*, 2002; Rodríguez, 1995; Page y Rowley, 1983).

Determinación de la condición corporal (Factor K).

La condición corporal o factor K , es un indicador del estado nutricional y un determinante del desempeño reproductivo, se obtiene tras multiplicar el peso con una constante y luego dividirla por el tamaño corporal elevada al cubo, como se indica en la figura 3. Los resultados se pueden mostrar en los rangos desde peces extremadamente pobre (0,8 a 0,99), pobre (1,0 a 1,19), seguido de aceptable (1,2 a 1,39), bueno (1,4 a 1,59) hasta, por último, el pez excelente (1,6 a 2) (Barnham y Baxter, 1998).

$$K = \frac{10^N W}{L^3}$$

Figura 3. Factor de condición K para salmónidos.

Determinación de los niveles plasmáticos de glucosa, hematocrito y hemoglobina.

La glucosa plasmática se estimó mediante el método colorimétrico enzimático de un solo reactivo de glucosa (preparado), en su forma líquida de la marca QCA (Trinder, 1969; Akinrotimi *et al.*, 2013). Los valores de hematocrito (Hto) se determinó por el método de microhematocrito usando, tubos capilares heparinizados (3/4 partes) y una centrifuga (centrifugación por 5 minutos a 3000 g) (Goldenfarb *et al.*, 1971). La cantidad de hemoglobina se determinó usando el equipo HemoCue® 201. En las cubetas HemoCue está presente el reactivo desoxicolato de sodio, que lisa los eritrocitos, luego el nitrito de sodio convierte la hemoglobina en metahemoglobina, que forma el complejo azida metahemoglobina, debido a la presencia de azida sódica. El HemoCue mide la absorbancia a dos longitudes de onda (570 y 880 nm), lo que compensa la turbidez de la sangre (Andrewartha, 2016). Sin embargo, la absorbancia se muestra reducida por la

presencia del núcleo en los eritrocitos de los peces, ya que el equipo fue diseñado para el uso en humanos. Por tal, el resultado se corrigió con una fórmula que se probó en varios salmónidos ($[Hb]=0,815*[HemoCue\{Hb\}]-2,198$) (Clark *et al*, 2008; Andrewartha, 2016).

Determinación de los parámetros eritrocitarios o hematimétricos.

Los datos hematimétricos como el volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina globular o corpuscular medio (HCM) y la concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM), se obtuvo aplicando sus respectivas fórmulas (Conroy y Conroy, 1987).

Determinación de cortisol plasmático.

La determinación de cortisol en plasma se realizó a través del kit de ELISA (Neogen corporation). La extracción de cortisol se realizó pipeteando 100 μ L de plasma en un tubo de vidrio, al cual se le agregó 1 ml de Éter etílico, se agitó con un vortex por un minuto y pasó a congelarse a -80 °C durante una hora para obtener la fase líquida mas no la orgánica en tubo eppendorf. El Éter etílico se evaporó dentro de los tubos eppendorf. Luego, se agregó 100 μ L del buffer de extracción (diluido x5), después de esta dilución se realiza una más (x100) agregando 10 μ L en 990 μ L de buffer de extracción diluido. Al finalizar, se agitó con ayuda de un vortex. En la placa de Elisa se colocó 50 μ L de la dilución para la lectura, que se realizó a 620 nm. Aparte se preparó siete muestras estándar para confirmar la calidad del kit (protocolo de Elisa en anexo 2) (Mota *et al.*, 2017). Las concentraciones de cortisol se cuantificaron con la ecuación de la curva estándar ($x = e^{[(52,589-y)/15,13]}$).

Evaluación de la actividad bactericida y aglutinación bacteriana.

Los valores de capacidad o actividad bactericida y aglutinación bacteriana representan parte del estado inmunológico del pez (Sueiro y Palacios, 2016). Una explicación más corta de la metodología está en la figura 2.

Análisis de la capacidad o actividad bactericida.

La capacidad bactericida del plasma se determinó de acuerdo con Matson *et al* (2006), con algunas modificaciones para su uso como lo describe Sueiro y Palacios (2016). Se suspendió aproximadamente 200 unidades formadoras de colonias (UFC) de *Escherichia coli* (ATCC 25922) en solución salina tamponada con fosfato estéril (PBS), para producir una “solución de trabajo” por 10 μ L. Todas las muestras de plasma se diluyeron 1:10 con PBS estéril. Las reacciones se prepararon añadiendo 10 μ L de la solución bacteriana (solución de trabajo) a 90 μ L de las muestras de plasma diluidas. Todas las reacciones de la muestra se incubaron durante 4 horas a 18 °C para proporcionar tiempo suficiente para que se produjera la muerte bacteriana. Se preparó tres reacciones de “control” añadiendo 10 μ L de la solución de trabajo bacteriana a 90 μ L de PBS, y se sembró antes, a mitad y después de plaquear las reacciones de la muestra. Todas las reacciones y controles de muestra se sembraron en placas por duplicado usando alícuotas de 50 μ L en agar soja tríptico al 4% y se incubó durante la noche a 25°C. Al final se contó el número de colonias bacterianas en cada placa y se calculó el porcentaje de colonias en cada placa por el número medio de colonias en placas control.

Análisis de aglutinación bacteriana.

La aglutinación bacteriana se determinó utilizando una placa de aglutinación. Las bacterias (*E. coli* ATCC 25922) se hicieron crecer en caldo de soja tríptico estéril (TSA). Luego, se fijó en formalina al 1%, durante la noche a 4 °C. Las bacterias fijadas se lavaron tres veces con PBS y se ajustó a una concentración de aproximada de 1×10^9 bacterias/ml. Se añadió muestras de plasma (40 μ L) a la primera columna de una placa de 96 pocillos y se diluyó en serie, dos veces a lo largo de las filas con PBS. Se incluyó un control negativo (PBS en lugar de plasma) en cada placa. A continuación se añadió 20 μ L de bacterias fijas a todos los pocillos. Las placas se agitaron en un vórtex y se incubó a temperatura ambiente durante la noche. Los títulos de aglutinación se determinaron como \log^2 de la dilución más alta mostrando aglutinación bacteriana (Sueiro y Palacios, 2016; Sahoo *et al.*, 2008; Plumb y Areechon, 1990).

Evaluación de la calidad de agua del río.

La calidad de agua se evaluó a través de los parámetros físico-químicos (temperatura, oxígeno disuelto, conductividad, turbidez, pH, alcalinidad total, dureza total, calcio y magnesio) *in situ* gracias a un equipo, multiparámetro Hanna (Hi 9829). Para los parámetros microbiológicos (coliformes totales y termo tolerantes), se colectó agua en envases de 250 ml, que fueron transportados en un cooler (en cadena de frío) en un lapso no mayor a las 24 horas al laboratorio de la Dirección de Saneamiento Ambiental Apurímac (DESA) (Palamuleni y Akoth, 2015). La metodología para el cálculo de los coliformes totales y termotolerantes, fue el método del número más probable (NMP) utilizando la técnica de tubos múltiples siguiendo las recomendaciones de la American Public Health Association (APHA, 2012). Brevemente, se utilizó Caldo Lauril Triptosa en volúmenes de 10 ml de concentración simple, para inóculos de 1 y 0.1 ml y de

doble concentración para inóculos de 10 ml, por triplicado en tubos provisto con campana Durham. Posteriormente, se incubó a 35°C por 24-48 horas, al cabo de este periodo se evaluó los tubos, considerándose como positivos aquellos con presencia de gas y turbidez. De los tubos positivos, se transfirió una asada a tubos con Caldo EC y se incubó a 44.5 °C por 24-48 horas. La formación de gas se consideró positivo a Coliformes Termo tolerantes. Seguidamente, se estimó el Número más probable en las tablas correspondientes de coliformes Totales por 100 ml y NMP de coliformes Fecales por 100 ml. Posterior, se realizó la comparación con los parámetros establecidos de Calidad de Agua (categoría III) del DS. N° 002-2008-MINAM.

IV. RESULTADOS

Evaluación del estado de salud o sanitario.

La evaluación del estado de salud o estado sanitario de los peces, se realizó a través de los parámetros hematológicos y niveles de cortisol y glucosa los cuales son base para el diagnóstico de anemia y estrés. Estos datos fueron comparados con sus valores de referencia (constantes normales de la trucha arcoíris) para observar si existen alteraciones de las constantes normales. Estos valores de referencia se obtuvieron de investigaciones, que se realizaron en ambientes similares.

Tras la prueba de *tukey*, cada parámetro presentó diferencias entre las ciudades estudiadas (ver tabla 1). Debido al diseño de la investigación, las truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) presentan pesos y tamaños similares. Sobre la conformación corporal, se observó, que las truchas de la zona de Chalhuanca son menos conformadas, que las zonas de Caraibamba y Cotaruse. El hematocrito en las dos últimas zonas muestreadas (Caraibamba y Chalhuanca) resultan no estar dentro de los valores de referencia (<35%). El conteo de glóbulos rojos mostró valores aceptables (RBC) con 1,35 (S1); 1,35 (S2) y 1,37 (S3) eritrocitos por 10⁶. El diagnóstico de anemia a través de las concentraciones de hemoglobina resultó ser inferior a los de referencia (<5,6 g/dL) en todos los sitios muestreados, S1 (4,4 mg/dL); S2 (4,3 mg/dL); S3 (4,1 mg/dL). Para dar una dirección y especificar el tipo de anemia se utilizó los valores hematimétricos como volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina corpuscular media (HCM) y la concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM). En tales parámetros el VCM en los tres lugares fueron menores a los normales (<275fl), lo que indica microcitosis. El bajo conteo de HCM caracteriza a un estado hipocrómico (<69 pg.).

Tabla 1. Promedio de las variables estudiadas para el análisis del estado sanitario de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en el río Chalhuanca.

Parámetros	Valores de referencia	Cotaruse (S1)	Caraibamba (S2)	Chalhuanca (S3)	P
Peso (g)	-	67,8 ±15,4 ^a	52,5 ± 11,8 ^a	57,3 ±24,1 ^a	0,117
Tamaño (mm)	-	174,1 ±13,7 ^a	163,8 ±10,1 ^a	166,9 ±20,8 ^a	0,232
Factor K	1,2- 2,0 ^p	1,27 ±0,1 ^a	1,19 ±0,1 ^{ab}	1,17 ±0,1 ^b	0,048
Hemoglobina (g/dL)	5,6- 9,4 ^{q:w;x}	4,4±0,9 ^a	4,3 ±0,9 ^a	4,1 ±0,6 ^a	0,671
Hematocrito (%)	35- 44 ^{q:v;x}	36,0 ± 3,8 ^a	33,8 ±2,9 ^a	29,9 ±4,3 ^b	0,001
RBC (10 ⁶)	1,30- 1,58 ^{q;x}	1,35 ±0,1 ^a	1,35 ±0,1 ^a	1,37 ±0,1 ^a	0,528
VCM (fl)	275- 369 ^{q;x}	266,3 ±33,8 ^a	249,5 ±28,7 ^a	216,9 ±29,7 ^b	0,002
HCM (pg.)	69- 102 ^{q;x}	32,5 ±6,9 ^a	31,3 ±6,3 ^a	29,8 ± 4,3 ^a	0,546
CHCM (g/dL)	12- 22 ^{q;x}	12,3 ±2,3 ^a	12,7 ±2,9 ^a	13,9 ±2,0 ^a	0,278
Glucosa (mmol/L)	3,89- 4,14 ^{t;y}	4,5 ±2,2 ^a	3,9 ±1,8 ^a	3,6 ±1,5 ^a	0,532
Cortisol (ng/ml)	6- 14,5 ^{r;s;z}	6,3 ±2,8 ^a	6,1 ±2,2 ^a	3,4 ±2,1 ^b	0,007

Nota: El valor de P refleja la diferencia de los parámetros entre las ciudades. Los valores colocados para cada ciudad están mostrados como la media y desviación estándar ($x \pm S$). Las medias, que no comparten una letra son significativamente diferentes entre una ciudad y la otra (^{a, b}). Los superíndices de los valores de referencia indican a los autores de donde se extrajeron: Barnham y Baxter, 1998^p; Rodríguez, 1995^q; Kubilay, 2002^r; Val *et al.*, 2006^s; Rojas, 2005^t; Velisek *et al.*, 2006^u; Quintana y Pereira, 2008^v; Clark, 2008^w; Jalali *et al.*, 2009^x; Martínez *et al.*, 2009^y; Gesto, 2014^z.

Después de analizar los valores del estado anémico y estrés, el 50% de las truchas arcoíris de Cotaruse presentan estrés crónico y aumenta en dirección del cauce del río, Caraibamba (75%) y Chalhuanca (91,7%). La presencia de anemia en las truchas arcoíris puede estar relacionada con el estrés crónico, ya que se encontró valores altos de anemia tipo microcítico e hipocrómico del 58,3% al 100% como se describe en la tabla 2.

Tabla 2. Estado de anemia y estrés como indicador de la salud de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en el río Chalhuanca.

Variable		Cotaruse (S1)	Caraibamba (S2)	Chalhuanca (S3)	Promedio (x)
Estrés	Sin estrés	50,0%	25,0%	8,3%	27,8%
	Estrés crónico	50,0%	75,0%	91,7%	72,2%
	Total	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
Estado Anémico	Sin anemia	8,4%	8,3%	0,0%	5,6%
	Anemia normocítica hipocrómica	33,3%	16,7%	0,0%	16,7%
	Anemia microcítica hipocrómica	58,3%	75%	100%	77,8%
	Total	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Las concentraciones de glucosa plasmática presentan una relación positiva moderada a las concentraciones de cortisol plasmático, como se muestra en la figura 4.

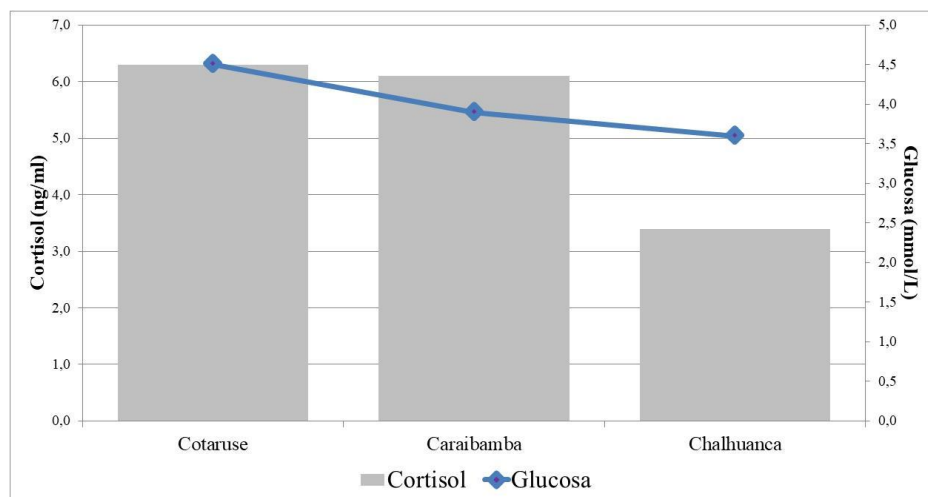


Figura 4. Correlación positiva de los niveles de glucosa y cortisol (ρ Spearman =0,4) entre las ciudades de Cotaruse, Caraibamba y Chalhuanca ($P < 0,05$).

Las concentraciones de hematocrito y cortisol plasmático parecen tener una relación positiva moderada a las concentraciones de oxígeno disuelto del agua, como se muestra en la figura 5.

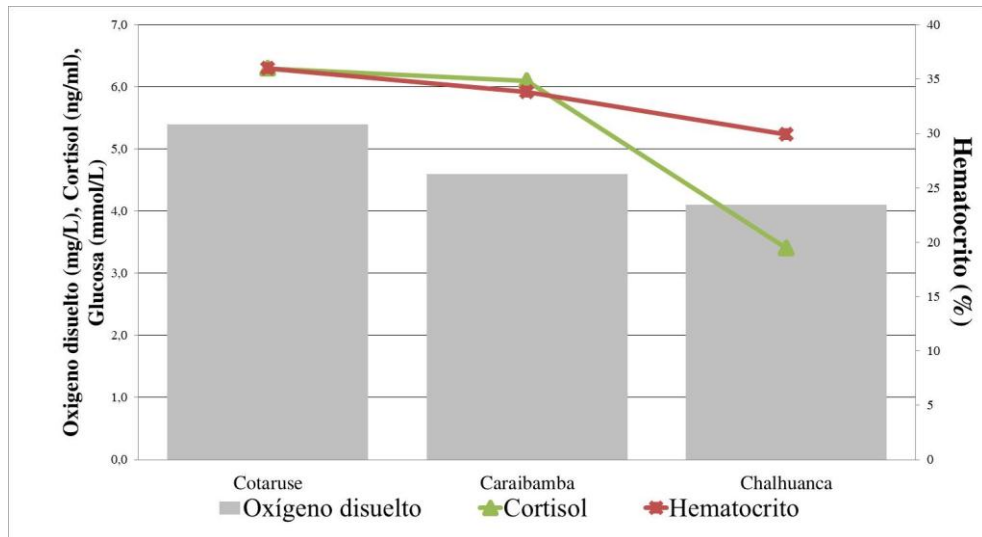


Figura 5. Comportamiento de los parámetros de hematocrito (ρ Spearman =0,55) y cortisol (ρ Spearman =0,41) a las concentraciones del oxígeno disuelto del agua del río Chalhuanca en cada ciudad ($P < 0,05$).

Evaluación de la respuesta inmunológica de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

Una de las técnicas para evaluar la respuesta inmunológica es la capacidad bactericida del plasma sanguíneo, la cual se midió por porcentaje de bacterias *E. coli* (ATCC 25922), que han sufrido lisis y son incapaces de crecer. Estos resultados, en los tres grupos muestran una gran variación referente a sus respuestas. Sin embargo, no existe diferencia, así los peces presentan capacidad bactericida frente a *E. coli* en 29,2% en Cotaruse, 30,2% en Caraibamba y 31% en

Chalhuauca. La aglutinación bacteriana se expresa como \log^2 , estos datos nos muestran también ser similares como se describe de mejor forma en la Tabla 3.

Tabla 3. Respuesta inmunológica de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en el río Chalhuauca.

Parámetro	Control	Cotaruse (S1)	Caraibamba (S2)	Chalhuauca (S3)	(P)
Cantidad de <i>E-coli</i> (UFC/placa)	201	142±51	140±30	139±37	0,9
Actividad bactericida (%)	60 ^a	29,2±25	30,2±14	31,0±18	0,9
Aglutinación bacteriana	6 ^a	2,1±1,6	2,1±2,1	1,9±1,5	0,9

Nota: Los datos se muestran como la media y desviación estándar ($x\pm S$). El valor control para la actividad bactericida y aglutinación bacteriana se extrajo de Suiro y Palacios (2016)^a. El valor de P refleja si hay diferencia entre las ciudades estudiadas.

Las concentraciones de cortisol y hematocrito presentaron una relación negativa moderada frente a las concentraciones de coliformes fecales del agua, mientras tanto, la actividad bactericida presentó una correlación muy baja. Este parámetro no muestra diferencias en las tres ciudades ($P>0,05$), como se muestra en la figura 6.

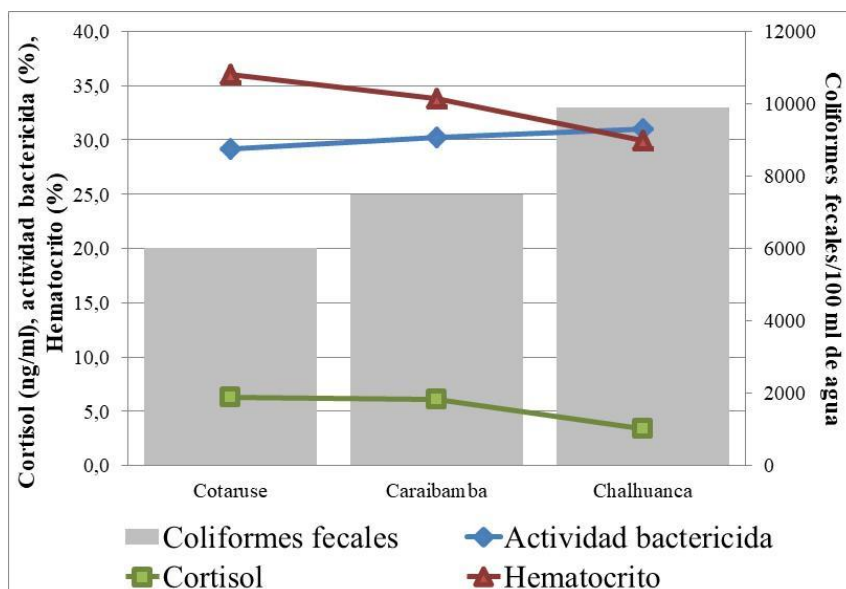


Figura 6. Relación de afinidad del cortisol (rho Spearman =-0,4), hematocrito (rho Spearman =-0,55) ($P < 0,05$) y actividad bactericida (rho Spearman =0,16) ($P > 0,05$) a la cantidad de coliformes fecales en el agua del río Chalhuanca para cada ciudad.

Calidad del agua del río Chalhuanca a través de los parámetros establecidos en el Estándar de Calidad de Agua (categoría III) en el DS. N° 002-2008-MINAM

La calidad de agua en los ambientes acuáticos son muy importantes para la supervivencia de especies acuáticas y terrestres. Sin embargo, cuando empiezan a existir desordenes en sus parámetros, empiezan los problemas. En el caso del río Chalhuanca se comparó los valores físico-químicos y bacteriológicos con lo establecido en el *DS. N° 002-2008-MINAM*, en sus parámetros, el oxígeno disuelto mostró estar al límite del valor mínimo (5mg/L), otro parámetro es la conductividad cuyos valores se encuentran dentro del rango (<2000), la turbiedad es otro factor importante en el bienestar de la trucha arcoíris, por su preferencia a aguas cristalinas pudiendo estar en el rango permisible (<25 NTU), el pH es otro parámetro, pero estos se mantuvieron dentro del límite máximo (8,5). De forma similar ocurre con los niveles de cloruros, que se encuentran por debajo del límite máximo (200 mg/L),

igual que la dureza total (<52 mg/L) y los niveles de calcio y magnesio (<52 y <150 mg/L). Concerniente a los valores bacteriológicos, se realizó el conteo de los niveles de coliformes totales y termotolerantes para cada ciudad, las cuales hallaron valores superiores al máximo permisible, 5 mil para coliformes totales y mil para coliformes termotolerantes (ver tabla 4).

Las concentraciones de oxígeno disuelto y factor de condición se encuentran negativamente relacionadas de forma perfecta y moderada respectivamente a las concentraciones de coliformes fecales del agua de río (figura 7), en cambio, las concentraciones de hemoglobina presentaron una correlación negativa muy baja.

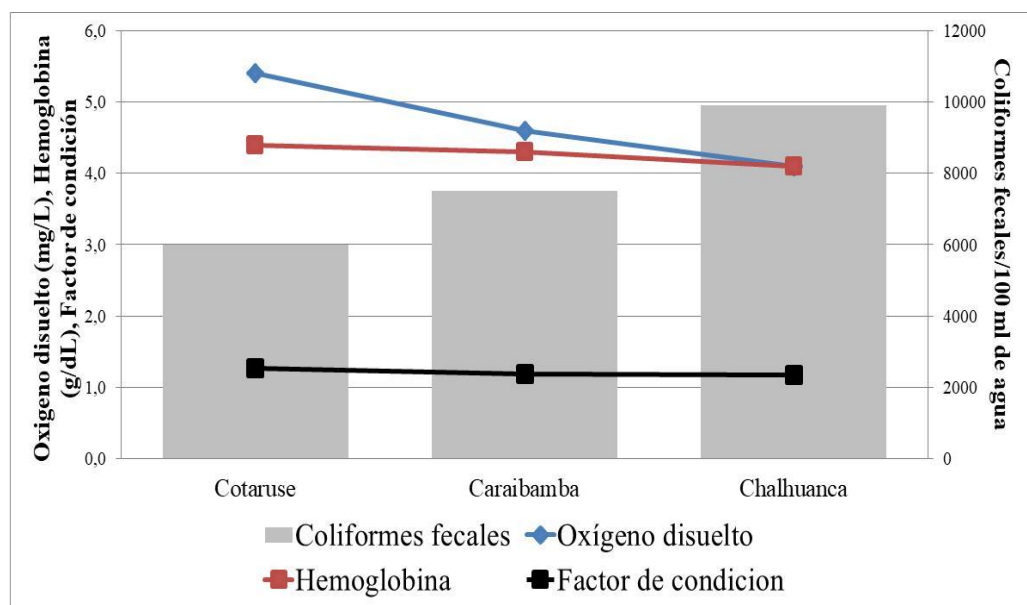


Figura 7. Relación de afinidad de las concentraciones de hemoglobina (ρ spearman = -0,12) ($P > 0,05$), oxígeno disuelto (ρ spearman = -1) y factor de condición (ρ spearman = -0,4) ($P < 0,05$) a la cantidad de coliformes fecales en el agua del río Chalhuanca en las diferentes ciudades.

Tabla 04. Parámetros físico químicos y microbiológicos del río Chalhuanca

	Parámetros	Valores de referencia	Cotaruse S1	Caraibamba S2	Chalhuanca S3
Análisis físico químico	Temperatura (°C)	10 a 16	11	13	14
	Oxígeno disuelto (mg/L)	>5,0	5,4	4,6	4,1
	Conductividad (µS/cm)	<2000	241	243	235
	Turbiedad (NTU)	<25,0	5,07	5,8	4,91
	pH	6,5 a 8,5	8,32	8,34	8,31
	Alcalinidad total (mg/L CaCO ₃)	20 a 200	113,4	109,2	105
	Cloruros	<200 mg/L	30	78	88
	Dureza total (mg/L CaCO ₃)	5 a 200	121,8	128,1	113,4
	Calcio (mg/L)	<52	31,08	42,84	41,16
	Magnesio (mg/L)	<150	10,73	5,11	2,56
Coliformes /100ml	Totales (35 °C)	<5000	14000	16530	17000
	Termo tolerantes (44,5 °C)	<1000	6000	7500	9900

V. DISCUSIÓN.

Para evaluar el estado de salud de la trucha arcoíris se tomaron varios parámetros (tabla 1). Uno de esos parámetros es el Factor K, que refleja la condición corporal y es un índice, que facilita la información de forma indirecta de la reproducción, nutrición, crecimiento y por tal la salud de las población ictícola, como también en comprender su ciclo de vida (Kumolu y Ndimele, 2010; Arismendi *et al.*, 2011). Además, es un índice útil para controlar las condiciones ambientales y evaluar el estado del ecosistema (Mushtaq *et al.*, 2016). La condición corporal, en los salmónidos, se puede calificar en los índices de muy pobre, pobre, aceptable, bueno y excelente (Barnham y Baxter, 1998). Los resultados obtenidos, denotan, que los peces de la ciudad de Cotaruse (río arriba) tienen una mejor conformación

(aceptable), que las ciudades de Caraibamba y Chalhuanca (pobres). El análisis estadístico, infiere que los peces de la ciudad de Chalhuanca son menos conformados, que los peces de la ciudad de Cotaruse. Esta baja condición corporal, también se halló en diferentes peces, de ambientes que están siendo contaminados como el lago Llanquihue (Chile) (Arismendi *et al.*, 2011), el lago Temenggong (Malasia) (Hamid *et al.*, 2015), el lago Wular (India) (Mushtaq *et al.*, 2016) y el río Gomti (India) (Gupta *et al.*, 2011), donde se observó que estas diferencias fueron por la poca disponibilidad de alimento, debido al aumento de residuos en el ambiente (Mushtaq *et al.*, 2016; Gupta *et al.*, 2011). Sucede de forma similar en *Lagocephalus laevigatus*, del área de Koluama y río Niger (Nigeria), cuyo factor de condición fue bajo a causa de la liberación de contaminantes (Ogamba y Abowei, 2012).

La concentración de hemoglobina en los peces, es importante para los estudios de adaptabilidad, porque infieren en el equilibrio entre el metabolismo del organismo y el ambiente (Riggs, 1979; Landini *et al.*, 2002). Estas concentraciones de hemoglobina entre las ciudades de Cotaruse, Caraibamba y Chalhuanca son similares, sin embargo, son menores a los valores de referencia (<5,6 g/dL), Esta baja concentración, explica que la calidad de agua del río está siendo afectada por sustancias tóxicas, especialmente las residuales (Zutshi *et al.*, 2010). Probablemente el objetivo de muchos contaminantes, particularmente el nitrito (NO₂) en la acuicultura, es la oxidación de hemoglobina a metahemoglobina (Ha y Choi, 2008). Esta oxidación causa la disminución del oxígeno arterial y promueve la presencia de cianosis, también afecta perjudicialmente sobre el crecimiento, resistencia a enfermedades, capacidad de nado e incluso promueve la muerte (Lacey y Rodnick,

2002). Un claro ejemplo serían los peces *Labeo rohita* de los lagos de Bangalore (India), donde los niveles de hemoglobina disminuyeron en los lugares contaminados con aguas residuales y desechos industriales (Zutshi *et al.*, 2010). Otro ejemplo, sería el realizado en Canadá, donde se observó, que los niveles de hemoglobina de la trucha arcoíris mantenida en condiciones hipóxicas y anemia, producidas químicamente (Phenylhydrazine), mantienen concentraciones relativas de 5 g/dL de hemoglobina (Simonot y Farrell, 2007). La temperatura también afecta las concentraciones de hemoglobina, es decir, que las concentraciones de hemoglobina esta correlacionada positivamente a los niveles de temperatura, como se observó en el pez cabeza de serpiente (*Channa punctatus*), sin embargo, las concentraciones de este parámetro en las temperaturas más frías del estudio (15°C) fueron parecidas (8,6 g/dL) a los valores referenciales de la trucha arcoíris (Ravichandra, 2012). Comparando estos trabajos con los obtenidos en el río Chalhuanca, se podría explicar, que el bajo conteo de hemoglobina no es producido por al estrés de la variación de temperatura, sino, por la presencia de aguas residuales y/o industriales.

El nivel de hematocrito en los peces refleja la capacidad de transporte de oxígeno y el funcionamiento hematopoyético (Ciftci *et al.*, 2008). Según nuestros resultados, las concentraciones de hematocrito de las truchas arcoíris en la ciudad de Chalhuanca (29,9%) son menores, que las truchas de Cotaruse y Caraibamba (36 y 33,8% respectivamente), también del valor de referencia (35 a 44%). Esta diferencia (al valor de referencia y entre las ciudades), puede ser debida a los cambios ambientales, que ocurren por el suministro de aguas residuales y demás contaminantes producidos por la actividad humana, que influyen no solo los

parámetros físico-químicos y microbiológicos, sino también, promueve la desaparición de las principales áreas donde *O. mykiss* suele desovar y por tal necesitaría ser más activo para compensar su tasa metabólica (Simonot y Farrell, 2007). Normalmente la tasa metabólica se regula dentro de tres semanas, sin embargo, si se mantiene, explicaría, que la contaminación está afectando a la presencia de alimento de los peces (Simonot y Farrell, 2007) y promueve la incapacidad del pez, para utilizar las reservas de células sanguíneas (Silkin y Silkina, 2005). Se puede sospechar, que una posible causa para la variación del hematocrito, fuese por la influencia de la temperatura, sin embargo, se ha estudiado, que los cambios de temperatura en *O. mykiss* y *C. auratus*, dentro del rango de 5 a 20 °C, no produce cambios significativos, lo cual explicaría, que el estrés por calor no es un determinante (Gallaughery y Farrell, 1998). Se ha observado en el pez *Labeo rohita*, que la exposición crónica a aguas residuales (Zutshi *et al.*, 2010), a niveles subletales de cobre en *C. carpio* (Dhanapakiam y Ramasamy, 2001), a cadmio en *Anguilla rostrata* (Gill *et al.*, 1993) y plomo en *T. tinca* disminuyen los niveles de hematocrito (Shah, 2006).

Los datos de glóbulos rojos (RBC) son potencialmente muy útiles en el control de la contaminación (Nikinmaa, 1992). Los valores del conteo de glóbulos rojos de *O. mykiss* en las ciudades estudiadas se mantuvieron en sus valores normales ($1,3$ a $1,58 \times 10^6$) y no existió diferencias entre estas, como tampoco fueron menores a los valores de referencia. Varios autores presentaron diferentes puntos de vista referentes a los valores de RBC en la sangre (de peces) en los lugares contaminados, y en la mayoría de ellos se explica, que varios productos químicos estimulan una condición hipóxica y por ende hay mayor producción de células

sanguíneas en los peces, esta liberación de glóbulos rojos maduros a la circulación general es estimulado por la acción β -adrenérgica en tejidos hematopoyéticos, que se contraen y liberan las células almacenadas, explicando el aumento en los recuentos de glóbulos rojos, debido a la estimulación de la eritropoyetina en respuesta a condiciones hipóxicas, debido al aumento de la actividad metabólica o la destrucción de las membranas branquiales (Pala y Dey, 2016). Nuestros datos se puede comparar con un estudio en *Gambusia affinis*, sobre el efecto tóxico de aguas residuales a colorantes textiles y se observó, que el RBC aumenta cuando la concentración de contaminante es mínima, pero disminuyen, cuando las concentraciones de contaminantes son mucho mayores (Soni *et al.*, 2006). Esto también sucedió en el pez *Channa punctatus*, en la India, en efluentes donde descargaban residuos de curtiduría, en donde se encontró disminución de RBC en los lugares donde hubo mayor concentración del contaminantes (Ravichandran *et al.*, 2016).

Los índices eritrocitarios como la hemoglobina corpuscular media (HCM), indica el funcionamiento del corazón y el equilibrio osmótico, el volumen corpuscular medio (VCM), indica el estado de la función respiratoria, y la concentración corpuscular media de la hemoglobina (CHCM), indica el porcentaje, que ocupa la hemoglobina en un eritrocito promedio (Atencio *et al.*, 2007). En referencia a los resultados obtenidos. La concentración de VCM, muestra, que las truchas arcoíris de la ciudad de Chalhuanca (216,9 fl) son diferentes a las ciudades de Cotaruse (266,3 fl) y Caraibamba (249,5 fl). En los parámetros de HCM y CHCM resultaron tener valores similares en todas las ciudades. Es importante aclarar, que, los resultados de estos parámetros en estas tres ciudades, se encuentran por debajo del

límite del valor de referencia. Estos datos nos indica la presencia de microcitocis (VCM<275 fl) acompañado de hipocromía (HCM< 69 pg y CHCM<12 g/dL). Según los estudios en *Hoplias malabaricus* en el lago de Pirassununga, en Brasil, indica que los parámetros HCM y VCM nos pueden indicar alteraciones de la calidad del agua, particularmente a factores físico-químicos (temperatura, sólidos disueltos totales, conductividad, oxígeno disuelto y presencia de agentes químicos) (Corrêa *et al.*, 2013). Existen productos de uso en la agricultura, que producen disminución de las concentraciones de Hb, HCM, CHCM y VCM como el Paraquat, que fue probado en el pez *Colossoma macropomum* (Salazar *et al.*, 2009), y el malathion en *Clarias batrachus* (Chowdhury y Haq, 2012). Datos similares se encontró en tres tipos de peces tropicales de la Isla de Mauricio, donde se encontró altos niveles de mercurio y se observó incremento de los niveles de VCM, la cual pudo haber estado desarrollada por efecto directo de las catecolaminas, el cortisol y la glucosa, sobre las actividades de adenilato ciclasa en los glóbulos rojos como respuesta a los esfuerzos hipóxicos agudos (Elahee y Bhagwant, 2007). Al sur de Bulgaria, se extrajo al pez *Carassius gibelio* de dos ríos donde hubo contaminantes humanos (residuos domésticos y metales pesados) y se encontró valores bajos de los índices eritrocitarios (HCM, CHCM y VCM) (Zhelev *et al.*, 2016). Otros contaminantes fueron evaluados, como los residuos de textilería en el pez *Labeo rohita* (Zutshi *et al.*, 2010), los residuos domésticos y los producidos por la industria del petróleo en *Gobius niger* (Katalay y Parlak, 2004) y se encontró, que los valores de VCM, HCM y CHCM son menores en estos ambientes, también se observó datos similares a los peces expuestos a zinc y plomo (Zutshi *et al.*, 2010).

A través de los resultados de los índices eritrocitarios, se obtuvo, que los peces en las tres ciudades presentaron dos tipos de anemia: la microcítica hipocrómica y la microcítica normocrómica (Conroy y Conroy, 1987). La microcitosis indica reducción del tamaño de un eritrocito, mientras que la hipocromía indica la concentración de hemoglobina por eritrocito (Conroy y Conroy, 1987). La causa más común de este tipo de anemia es la disminución de las reservas de hierro del cuerpo, que puede deberse a múltiples razones, entre las cuales está la disminución de hierro en la dieta, la mala absorción del hierro del intestino, el aumento de la demanda de hierro, en ciertas situaciones como la recuperación de un trauma (Bakrim *et al.*, 2018). Otra de las causas de la anemia microcítica hipocrómica es la hemorragia o hemólisis, ya que la regeneración de los eritrocitos inmaduros, constituye la mayoría de las células en la circulación periférica y es más pequeña en tamaño, que los eritrocitos maduros (Clauss *et al.*, 2008). Estas células inmaduras pueden estar presentes como respuesta a estresores ambientales (hipoxia, tóxicos o cambios de temperatura) (figura 5) (Clauss *et al.*, 2008). Las enfermedades no infecciosas también pueden manifestarse en la sangre de los peces, que a menudo están asociados a la acuicultura y al ambiente (Clauss *et al.*, 2008). Entre las enfermedades relacionadas con la cría, una anemia microcítica normocrómica puede ser el resultado de factores ambientales estresantes, como el aumento de la densidad de poblacional (Witeska, 2015), intoxicación por nitritos (enfermedad de la sangre parda o síndrome del nuevo tanque) (Avilez *et al.*, 2004), intoxicación por amoníaco y metales pesados, que pueden provocar diversas formas de anemia no regenerativa (Groff y Zinkl. 1999) y las producidas por la exposición crónica a cipermetrina (insecticida piretroide sintético), que puede causar

agrandamiento de los eritrocitos o una morfología anormal a la cual llaman anemia macrocítica (Clauss *et al.*, 2008). Otra causa de este tipo de anemia son las desarrolladas por parásitos como es el caso del pez *Carassius carassius* del río Asakawa en relación a las infestaciones por un trematodo *Diplozoon nipponicum*, que originó en el pez un estado anémico microcítico hipocrómico (Kawatsu, 1978). El diagnóstico diferencial de la anemia microcítica hipocrómica puede ser talasemia, anemia por enfermedades crónicas e intoxicación por plomo (Rodrigues *et al.*, 2017).

También una de las causas probables de los desórdenes hematológicos pudo deberse a factores nutricionales, como es el caso en los estudios donde se realizó la inclusión del extracto de *Sargassum angustifolium* en *O. mykiss* (Zeraatpisheh *et al.*, 2018) o el de Spirulina al 5% en Parrot fish (Kim *et al.*, 2013) o el extracto de *Ulva clathrata* en tilapia del Nilo (Quezada y Fajer. 2017) y otros insumos, los cuales no se ha investigado en el presente, y sin embargo, existe evidencia que modifican los valores de RBC, Hb, Hto y CHCM (Adel *et al.*, 2016).

Cuando el estrés se muestra, existe una preparación del cuerpo para actuar, que se llama respuesta de lucha o huida y se produce por la liberación de muchas hormonas, que estimulan el aumento de las concentración de glucosa en el torrente sanguíneo (Jentoft *et al.*, 2005). Las concentraciones de glucosa plasmática de las truchas arcoíris en las ciudades estudiadas mostraron no ser diferentes, pero los peces de la ciudad de Chalhuanca tienen concentraciones (3,6 mmol/L) inferiores a los valores de referencia (3,8 mmol/L). En el río Setnica (en Serbia), que sufrió grandes procesos de contaminación en todo su recorrido, se observó, que los peces *C. carassius* y *G. obstrusirostris* presentaron altos niveles de glucosa (5,5 y 6,6

mmol/L respectivamente) en los sitios altamente contaminados (Valon *et al.*, 2013). En los cuerpos de agua de Bangladesh se halló niveles altos de glucosa en el pez *Heteropneustes fossilis*, lo cual se relacionó con las concentraciones altas de iones cromo, que existe en el agua, este aumento del nivel de glucosa se debe a la alta secreción de hormonas como catecolaminas, glucocorticoides y que conducen a un aumento de la glucólisis, que resulta en un alto nivel de glucosa en la sangre (>4,88 mmol/L) (Hoq *et al.*, 2015). El análisis estadístico muestra a los datos de las tres ciudades como valores similares, aunque las truchas de la ciudad de Chalhuanca sean ligeramente menores. Este hecho se puede explicar como un efecto fisiológico de aclimatación al tóxico, el cual concuerda con un trabajo en *O. mykiss* en Inglaterra, que fue expuesta de forma crónica a cobre en la dieta y se observó la no perturbación de la glucosa plasmática como también del consumo de oxígeno, tasa de ventilación y en su química sérica (triglicéridos y proteínas) (Handy *et al.*, 1999). La trucha pasó significativamente menos tiempo realizando actividades rutinarias de natación, sugiriendo un secuestro de recursos metabólicos para la aclimatación al tóxico (Handy *et al.*, 1999). Además, el metabolismo está íntimamente asociado con el estado conductual de los peces, porque altera el metabolismo normal, lo cual podrían tener profundas influencias en el comportamiento de los peces (Scott y Sloman, 2004). En el lago Qarun en Egipto, indicaron que los peces generaron más glucosa para producir la energía utilizada en la lucha contra el estrés inducido en los peces por la contaminación ambiental, esta elevación en el nivel de glucosa, que se observó, pudo deberse al aumento o inhibición de la glucogénesis y la glucogenólisis (Sabaie y Mohamed, 2015).

La respuesta al estrés, produce la activación de muchas respuestas fisiológicas, entre las principales esta la liberación de catecolaminas y cortisol (Jentoft *et al.*, 2005). Los valores de cortisol de *O. mykiss* en las localidades de Cotaruse y Caraibamba se mantuvieron en los valores normales (6 a 14,5 ng/ml), sin embargo, fueron menores y diferentes a la ciudad de Chalhuanca (3,4 ng/ml), Cualquier cambio, que se produce en los factores físico-químicos (figura 5) y microbiológicos del agua como los cambios de temperatura, oxígeno disuelto (Currie *et al.*, 2004), la salinidad (Barton y Zitzow, 1995), hora del día (Davis *et al.*, 1984), longitud de onda de luz (Volpato y Barreto, 2001), incluso el color de fondo de los tanques (Gilham y Baker, 1985), el estado nutricional del pez (Barton *et al.*, 1988) y la presencia de enfermedades (Barton *et al.*, 1986), generan que los peces respondan, exacerbando o atenuando la respuesta de cortisol (figura 6) (Barton, 2002). Se ha demostrado, que la exposición de estos factores durante un periodo de diez minutos, en *O. mykiss*, estimula la liberación de cortisol sérico (60 ng/ml) (Kubilay y Uluköy, 2002) y en *Salmo salar*, a los cinco minutos (Flodmark *et al.*, 2002), pero la exposición crónica, produce en los peces un estado de adaptación al tóxico (dentro de seis días), que reducen los niveles de cortisol hasta por debajo de lo normal (<6 ng/ml) (El-Khaldi, 2010). Si el factor estresante es severo o duradero, es posible que el pez no sea capaz de sobrellevarlo y como resultado, ingrese en un estado de inadaptación o angustia, que conduce a una disminución del rendimiento, una afección patológica o posiblemente la muerte (Barton *et al.*, 2002). Esta inadaptación, está relacionada con los niveles elevados de cortisol en plasma, ya que aumentan la susceptibilidad de los peces a las infecciones por hongos, bacterias y parásitos (Kubilay y Uluköy, 2002). Elevadas concentraciones de cortisol se

reportaron en las localidades de Soria, Quintanar de la Sierra y Acera de la Vega (España) en *Salmo trutta* (160 ng/ml) (Val *et al.*, 2006). Concentraciones bajas de cortisol sérico también puede promover la susceptibilidad a infecciones (Heim *et al.*, 2000) como los reportados en *O. mykiss* del río Arlanza (España) (Val *et al.*, 2006). Varias investigaciones en mamíferos han proporcionado evidencia, de que la glándula suprarrenal es hipoactiva en algunos estados relacionados con el estrés agudo o crónico, esto se interpreta como la falta persistente de disponibilidad de cortisol en la sangre, y que puede promover mayor vulnerabilidad para el desarrollo de trastornos corporales relacionados con el estrés (Hannibal y Bishop, 2014; Heim *et al.*, 2000).

La identificación de estrés a través de pruebas de ELISA, no es una única prueba capaz de utilizarse, existe estudios en que el status de estrés crónico también podría evaluarse mediante análisis de los transcritos de genes de Arginina vasotocina (AVT) (estimulan la producción de ACTH durante el estrés), estos AVT podría ser capaz de diferenciar el estrés agudo y crónico, además la investigación refuerza la idea de que el sistema fisiológico se acostumbra a los estresores crónicos (Gilchriest *et al.*, 2000).

Referente a la actividad inmunológica. La actividad antibacteriana o capacidad bactericida del suero sanguíneo se considera una respuesta inespecífica para inhibir el crecimiento de microorganismos infecciosos (Yano, 1996). El perfil de la respuesta sérica de *O. mykiss* se muestra en la Tabla 3 e indica, que este es un ensayo confiable para estudios inmunes en peces. La presentación de los valores en UFC se utiliza ampliamente en diversos estudios como en el que se evaluó la actividad bactericida sérica de *Oreochromis niloticus* con el propósito de determinar el efecto

de *Bacillus subtilis* y *Lactobacillus acidophilus* como posibles probióticos (Aly *et al.*, 2008) o el efecto de *Achyranthes aspera* sobre la inmunidad de *Labeo rohita* infectada con *A. hydrophila* a través de este parámetro inmune (Rao *et al.*, 2006), aunque los valores de conteo de UFC de cada estudio pueden ser diferentes, debido a sus respectivas modificaciones y concentración de bacterias aplicadas en la prueba de desafío (Takahashi *et al.*, 2013).

La actividad bactericida sérica evalúa las respuestas inmunológicas de los peces en porcentajes (Takahashi *et al.*, 2013), esta unidad es presentada en varios estudios como la investigación donde se evaluó la actividad bactericida para observar el efecto del β -glucano en los alevines *Labeo rohita* (Misra *et al.*, 2006), también el estudio donde se evaluó el efecto de *Euglena viridis* en la respuesta inmune de *L. rohita* (Das *et al.*, 2009) y otro estudio es donde se comprobó la actividad bactericida de los peces tras la administración a largo plazo de levamisol (Misra *et al.*, 2009). Este parámetro es de importancia en los estudios de inmunología, debido a su capacidad para evaluar los sistemas de defensa innata, ya que las respuestas del sistema inmune pueden verse influenciadas o manipuladas por varias sustancias o procesos (Takahashi *et al.*, 2013) como los niveles de estrés, además, de la edad, el sexo o por la exposición a patógenos y/o contaminantes (Roszell y Anderson, 1997).

La diseminación y desarrollo de bacterias en diferentes tejidos y parte de los peces como el tracto gastrointestinal, las branquias, los músculos, los riñones y la vejiga natatoria, se han reportado en ambientes acuáticos contaminados (Guzmán *et al.*, 2004). Sin embargo la *E. coli* no es una bacteria natural de la micro flora intestinal

de los peces, pero a menudo se les ha hallado en el estómago e intestino (Barbosa *et al.*, 2014; Guzmán *et al.*, 2004).

En el estudio se evaluó la actividad bactericida sérica de *O. mykiss* de vida libre y se comprobó, que los peces de las tres ciudades de muestreo fueron estadísticamente similares ($\approx 30\%$), pero fueron menores al valor de referencia (60%) para inhibir la capacidad de colonización de *E. coli*. Resultados parecidos también se observó en un estudio, que tras la exposición a niveles subletales de hipoxia y bajos de pH en agua, suprimen la actividad bactericida entre un 23 y 72% en el pez *Fundulus heteroclitus* (Boleza *et al.*, 2001). Esta poca actividad bactericida, también se evidenció en peces con infecciones secundarias como las especies parasitarias, bacterianas (*Yersinia ruckeri*) o protozoarias (*Myxobolus cerebralis*) (Densmore *et al.*, 2004). Las infecciones parasitarias no está muy claro, ya que pueden suprimir y en otros puede mejorar la actividad bactericida (Iwanowicz, 2011). Otros, demuestran que los contaminantes como los metales pesados (Wang *et al.*, 2016), medicamentos corticoesteroides y no esteroideos (Ribas *et al.*, 2016), drogas usadas en la salud animal terrestre y en la acuicultura como el florfenicol, ácido oxolínico y oxitetraciclina (Cao *et al.*, 2004), los hidrocarburos aromáticos, pesticidas y micotoxinas en altas concentraciones o expuestas de forma crónica en el ambiente acuático disminuyen esta capacidad (en 50 a 80%) y aumentan la susceptibilidad del huésped a los patógenos infecciosos (Kum y Sekkin, 2011).

Un factor también importante para medir el estado inmunitario es la aglutinación bacteriana, que es una reacción de unión entre anticuerpos específicos y un antígeno en particular, como la suspensión de células bacterianas, y generalmente se aplica en el estudio de respuestas inmunes adaptativas para evaluar la producción de

anticuerpos (Takahashi *et al.*, 2014; Yildirim *et al.*, 2003). Según el análisis estadístico de nuestros datos, se pudo hallar, que los títulos de aglutinación en las tres ciudades son similares entre sí, y que hubo estimulación inmunológica de *O. mykiss* frente a *E. coli* (título ≈ 2), pero resultan inferiores al reportado por Suiro y Palacios (2016) y Silva *et al.* (2009), quienes reportan un título mínimo de seis como indicativo óptimo. Este bajo resultado, también se encontró en *Oreochromis niloticus*, tras la exposición de cepas de *E. coli* obtuvieron, que los títulos de aglutinación disminuyeron de 8 ± 1 (7 días) a $4,6 \pm 3,3$ (21 días) (Silva *et al.*, 2009). Esta reducción de los títulos de aglutinación también se presentaron en el pez *Cyprinus carpio*, de títulos de 6 (día 5) a 4 (día 20), tras suministrar hojas de *Euphorbia hirta* (5 g/kg) en el alimento para inmunoestimular las reacciones de aglutinación frente a *Aeromonas hydrophila* (Pratheepa y Sukumaran, 2014). Esta disminución de los títulos de aglutinación pueda estar desarrollado por la liberación de cortisol, ya que en estados de estrés moderado, severo o en una reinfección, produce inmunosupresión (Einarsdóttir *et al.*, 2000).

La evaluación del tercer objetivo del estudio fue referente a la calidad del agua del río. Uno de los factores fundamentales, para que la vida pudiese prosperar es el agua (Khanna *et al.*, 2007). Existen diversos procesos naturales, que se realizan en los cuerpos de agua y están relacionados con el ambiente como los originados por la escorrentía de aguas superficiales o los generados por la descarga de aguas residuales o industriales, que alteran varios nutrientes de los ecosistemas acuáticos y producen la muerte de estos sistemas (Parveen *et al.*, 2013). Las lluvias en la sierra del Perú empiezan a inicios de diciembre, por lo tanto, el mejor momento para el muestreo fue después de esta etapa, en mayo, de acuerdo a las condiciones

locales (Padmalal *et al.*, 2008). En las ciudades estudiadas, el uso primordial de la tierra en las áreas aguas arriba no es similar al de las áreas aguas abajo, por lo que no se puede esperar un impacto similar, es más existe un flujo aguas abajo más grande y, por lo tanto, también un mayor movimiento de contaminantes (Aazami *et al.*, 2015). Los parámetros microbiológicos se muestran sobrepasando los límites permitidos por el D.S. 002-2008-MINAM, aunque los físico-químicos se encuentran de forma permisible, excepto los niveles de oxígeno disuelto (<5 mg/L). Los niveles de pH se encuentran dentro de los valores de referencia, sin embargo, se mantienen cercanos (8,34) al límite de alcalinidad (<8,5). La minería en los lugares de estudio se ubica a varios kilómetros de la ciudad de Caraibamba (aguas arriba), por lo que su efecto dañino, en los lugares donde se promueve la acuicultura, podría ser menos intenso que los lagos y riachuelos que se encuentran alrededor. Las necesidades del hombre han llevado a colocar efluentes residuales a lo largo del río Chalhuanca asfixiando el ecosistema, como varios casos similares en otros ríos, que son depósitos residuales (Padmalal *et al.*, 2008). La armonía en un ecosistema se conserva cuando el pH se encuentra entre 6.5 y 8.5; los extremos de este parámetro dificultan la persistencia de los organismos vivos (Aazami *et al.*, 2015).

La temperatura es uno de las principales causas ecológicas, que interviene en el comportamiento fisiológico y la distribución de los organismos (Aazami *et al.*, 2015). Según nuestros resultados, las variaciones diurnas en la temperatura atmosférica fueron menores en el agua en los tres sitios de muestreo (11 a 14 °C), con un ligero aumento en la ciudad de Chalhuanca, pero aún se mantuvieron dentro del rango. Este ligero aumento pudo ser desarrollado por el aumento de la

temperatura atmosférica, en las ciudades río abajo como también por la mayor superficie de contacto de las escorrentías, facilitando el calentamiento (Vliet *et al.*, 2011)

Una serie de compuestos como los carbonatos, bicarbonatos, hidróxidos, fosfatos, nitratos, silicatos, borato, etc., contribuyen a la alcalinidad del agua (Chandrashekar *et al.*, 2003). Sin embargo en la presente investigación se encontró niveles dentro de lo normal, como también cierta alteración en el oxígeno disuelto (<5 mg/L). En varios estudios se demostró, que niveles de oxígeno disuelto por debajo de 5 mg/L dañan a la mayor parte de los organismos acuáticos, es decir, dificultan el crecimiento normal de las truchas arcoíris, y por debajo de 2 ppm los peces mueren (Parveen *et al.*, 2013; Nnaji *et al.*, 2010).

La presencia de cloruros en las corrientes de aguas residuales se debe al sector industrial, que utiliza compuestos de cloruro orgánico e inorgánico. La presencia de concentración de cloruro en la fuente de agua se utiliza como un indicador de contaminación orgánica por aguas residuales domésticas (Venkataraman *et al.*, 2007). El nitrato es la forma oxidada del nitrógeno y en el agua su fuente más importante es la oxidación biológica de la materia orgánica nitrogenada de origen autóctono y alóctono, que incluyen aguas residuales domésticas, escurrimientos agrícolas y efluentes de industrias (Choudhary *et al.*, 2011). La eliminación de ambos sólidos en suspensión conduce a la sedimentación (Gauthier *et al.*, 2000). Los sólidos sedimentables incluyen sólidos inorgánicos y no disueltos, que se depositan en el fondo de los estanques causando la sedimentación de la presa (Shivashranappa y Yalakpalli, 2012). Estos hallazgos indican o hacen suponer, que el agua del río Chalhuanca está sufriendo cierto tipo de contaminación como refleja

los altos niveles de coliformes fecales y también los bajos niveles de oxígeno disuelto (figura 7).

VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La contaminación humana en la cuenca del río Chalhuanca esta directamente relacionada con el estado de salud y de ciertas características inmunes de las truchas arcoíris (*Oncorynchus mykiss*).

- A la evaluación de las variables hematológicas de las trucha arcoíris (*Oncorynchus mykiss*) en el río Chalhuanca se detectó estrés crónico y anemia.
- Las trucha arcoíris (*Oncorynchus mykiss*) en el río Chalhuanca presentan una reducida capacidad bactericida y aglutinación bacteriana frente a *E. coli*.
- El agua del río Chalhuanca sobrepasa los parámetros microbiológicos establecidos por el Ministerio del Ambiente (DS. N° 002-2008-MINAM)

RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar evaluaciones periódicas y en diferentes estaciones, debido a la presencia de características favorable para la acuicultura y complementar a la investigación con estudios parasitológicos e histológicos.

VII. BIBLIOGRAFÍA.

1. [APHA] American Public Health Association. 2012. Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water. 22nd Edition, American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation.
2. [MINEM] Ministerio de Energía y Minas. 2011. Perú: Proyectos mineros del futuro. Revista proveedor minero. Promotores multimedia SAC. 1: 1-11
3. Aazami J., Esmaili S., Abdoli A., Sohrabi H., Van D., 2015. Monitoring and assessment of water health quality in the Tajan River, Iran using physicochemical, fish and macroinvertebrates indices. J. Environ. Health Sci. Eng. 13 (29): 1-12
4. Abreu J., Takahashi L., Hoshiba M., Urbinati E. 2009. Biological indicators of stress in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) after capture. Braz. J. Biol. 69: 415-421.
5. Adel M., Pourgholam R., Zorriehzahra J., Ghiasi M. 2016. Hemato immunological and biochemical parameters, skin antibacterial activity, and survival in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following the diet supplemented with *Mentha piperita* against *Yersinia ruckeri*. Fish Shellfish Immun. 55: 267 – 273
6. Akinrotimi O., Orlu E. Gabriel U. 2013. Haematological responses of *Tilapia guineensis* treated with industrial effluents. Appl. Ecol. and Environ. Sci. 1: 10-13.
7. Álvarez F. 1997. Evaluación hematológica de tres especies de peces *Ictalurus punctatus*, *Morone exatilis* y *Micropterus salmoides* en condiciones de

desnutrición. [Tesis de Maestría]. Universidad Autónoma de Nuevo León, México.

8. Aly S., Ahmed A., Ghareeb A., Mohamed M. 2008. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. *Fish Shellfish Immunol.* 25: 128-136.
9. Andrewartha S., Munns S., Edwards A. 2016. Calibration of the HemoCue point-of care analyser for determining haemoglobin concentration in a lizard and a fish. *Conserv. Physiol.* 4: cow 006.
10. Arismendi I., Penaluna P., Soto D. 2011. Body condition indices as a rapid assessment of the abundance of introduced salmonids in oligotrophic lakes of southern Chile. *Lake and Reservoir Management* 27: 61-69.
11. Atencio G., Genes L., Madariaga M., Pardo C. 2007. Hematología y química sanguínea de juveniles de Rubio (*Salminus affinis* Pisces: Characidae) del Río Sinú. *Acta Biolo. Colomb.* 12(S3): 27-40.
12. Avilez I., Altran A., Aguiar L., Moraes G. 2004. Haematological responses of the neotropical teleost matrinxã (*Brycon cephalus*) to environmental nitrite. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 139: 135-139
13. Bakrim S., Ouarour A., Jaidann K., Benajiba M., Masrar A. 2018. Profil de l'hémogramme et intérêt de la mesure de l'hémoglobine pré-don chez des donneurs de sang de la région Nord-Ouest du Maroc. *Transfus. Clin. Biol.* 25: 35-43.
14. Barbosa M., Pinto F., Ribeiro L. Guriz C., Ferraudo A., Maluta R., Rigobelo E., Ávila F., Amaral L. 2014. Serology and patterns of antimicrobial

- susceptibility in *Escherichia coli* isolates from pay-to-fish ponds. Food Safety. Arq. Inst. Biol. 81: 43-48.
15. Barnham C. Baxter A. 1998. Condition Factor, K, for salmonid fish. Fisheries Note. 05: 1-3.
 16. Barton B. 2002. Stress in Fishes: A Diversity of Responses with Particular Reference to Changes in Circulating Corticosteroids. Integ. and Comp. Biol., 42: 517-525.
 17. Barton B., Schreck C., Fowler L. 1988. Fasting and diet content affect stress-induced changes in plasma glucose and cortisol in juvenile Chinook salmon. Prog. Fish. Cult. 50 (1): 16-22
 18. Barton B., Schreck C., Sigismondi L. 1986. Multiple acute disturbances evoke cumulative physiological stress responses in juvenile chinook salmon. Trans Am Fish Soc. 115(2): 245-251
 19. Barton B., Zitzow R. 1995. Physiological responses of juvenile walleyes to handling stress with recovery in saline water. Prog. Fish. Cult. 57: 4: 267-276.
 20. Boleza K., Burnett L., Burnett K. 2001. Hypercapnic hypoxia compromises bactericidal activity of fish anterior kidney cells against opportunistic environmental pathogens. Fish Shellfish Immunol. 11: 593–610.
 21. Bols N., Brubacher J., Ganassin R., Lee L. 2001. Ecotoxicology and innate immunity in fish. Developmental and Comparative Immunology. 25: 853-873.
 22. Cao J., Li X., Zhao Y. 2004. Effects of florfenicol and chromium (III) on humoral immune response in chicks. Asian. Aust. J. Anim. Sci. 17: 366-370.

23. Chandrashekar J., Babu K., Somshekar R. 2003. Impact of Urbanization on Bellandur Lake, Bangalore, a case study. *J. Environ. Biol.* 24(3): 223-227.
24. Choudhary A., Kumar S., Sharma C. 2011. Constructed wetlands: An option for pulp and paper mill wastewater treatment, *Electron. J. Environ. Agric. Food Chem.* 10(10): 3023-3037.
25. Chowdhury A., Haq M. 2012. Alteration of Haematological parameters of “Zeol fish” *Clarias batrachus* exposed to Malathion. *Bangladesh. J. Zool.* 40 (2): 183-188.
26. Ciftci S., Cicik B., Erdem C., Ay O. 2008. Effects of Lead Concentrations on Sera Parameters and Hematocrit Levels in *Anguilla anguilla* L, 1758. *J. Fish Sci. Com.* 2(4): 616-622.
27. Clark T., Eliason E., Sandblom E., Hinch S., Farrell A. 2008. Calibration of a hand-held haemoglobin analyser for use on fish blood. *J. Fish Biol.* 73: 2587-2595.
28. Clauss T., Dove A., Arnold J. 2008. Hematologic disorders of fish. *Vet. Clin. Exot. Anim.* 11: 445-462.
29. Conroy D., Conroy G. 1987. Manual de métodos de diagnóstico en ictiopatología, con especial referencia a los salmónidos. FAO. Documento de campo 4 (Esp). Brasilia, Brasil.
30. Corrêa L., Karling L., Takemoto R., Ceccarelli P., Ueta M. 2013. Hematological parameters of *Hoplias malabaricus* (Characiformes: *Erythrinidae*) parasitized by Monogenea in lagoons in Pirassununga, Brazil. *Revta Bras. Parasitol. Vet.* 22(4): 457-462.

31. Currie R., Bennett W., Beitinger T., Cherry D. 2004. Upper and lower temperature tolerances of juvenile freshwater game-fish species exposed to 32 days of cycling temperatures. *Hydrobiologia*. 532: 127-136.
32. Damon R. Bohl R., Bolden S., Fox D., Hager C., Hickson B., Hilton E., Mohler J., Robbins E., Savoy T., Spells A. 2010. Atlantic Sturgeon research techniques. NOAA Technical Memorandum NMFS-NE-215: 19.
33. Das B., Pradhan J., Sahu S. 2009. The effect of *Euglena viridis* on immune response of rohu, *Labeo rohita* (Ham.). *Fish Shellfish Immunol*. 26: 871–876.
34. Davis K., Suttle M., Parker N. 1984. Biotic and Abiotic Influences on Corticosteroid Hormone Rhythms in *Channel Catfish*. *Trans. Am. Fish Soc.* 113 (4): 414-421
35. Densmore C., Ottinger C., Blazer V., Iwanowicz L., Smith D. 2004. Immunomodulation and disease resistance in postyearling rainbow trout infected with *Myxobolus cerebralis*, the causative agent of whirling disease. *J. Aquat. Anim. Health*. 16(2): 73-82.
36. Dhanapakiam P., Ramasamy V. 2001. Toxic effects of copper and zinc mixtures on some haematological and biochemical parameters in common carp, *Cyprinus carpio* (Linn). *J. Environ. Biol*. 22: 105-111.
37. Dunier M. 1996. Water pollution and immunosuppression of freshwater fish. *Ital. J. Zool*. 63(4): 303-309.
38. Einarsdóttir I., Nilssen K., Iversen M. 2000. Effects of rearing stress on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) antibody response to a non-pathogenic antigen. *Aquaculture Research*. 31: 923 – 930.

39. Elahee K., Bhagwant S. 2007. Hematological and gill histopathological parameters of three tropical fish species from a polluted lagoon on the west coast of Mauritius. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 68: 361-371.
40. El-Khaldi A. 2010. Effect of different stress factors on some physiological parameters of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Saudi J Biol Sci.* 17: 241-246.
41. Esser A. 1994. The membrane attack complex of complement. Assembly, structure and cytotoxic activity. *Toxicology* 87: 229-247.
42. Flodmark L., Urke H., Halleraker J., Arnekleiv J., Vøllestad L., Poléo A. 2002. Cortisol and glucose responses in juvenile brown trout subjected to a fluctuating flow regime in an artificial stream. *J. Fish Biol.* 60: 238-248.
43. Gallagher P., Farrell A. 1998. Hematocrit and blood oxygen-carrying capacity. *Fish Physiology.* 17: 185-227.
44. Gauthier F., Neufeld J., Driscoll B., Archibald F., 2000. Coliform bacteria and nitrogen fixation in pulp and paper mill effluent treatment systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 5155-5160.
45. Gesto, M., Otero-Rodiño, C., López-Patiño, M.A., Míguez, J.M., Soengas, J.L., Conde-Sieira, M., 2014. Is plasma cortisol response to stress in rainbow trout regulated by catecholamine-induced hyperglycemia? *Gen. Comp. Endocrinol.* 205, 207–217
46. Gilchrist B., Tipping D., Hake L., Levy A., Baker B. 2000. The effects of acute and chronic stresses on vasotocin gene transcripts in the brain of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Neuroendocrinology.* 12: 795 – 801.

47. Gilham I. and Baker B. 1985. A black background facilitates the response to stress in teleosts. *J. Endocr.* 105: 99-105.
48. Gill T., Leitner G., Porta S., Epple A. 1993. Response of plasma cortisol to environmental cadmium in the eel, *Anguilla rostrata* Lesueur. *Comp Biochem Physiol.* 3: 489-495.
49. Goldenfarb P., Bowyer F., Hall T., Brosious E. 1971. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. *Am. J. Clin. Pathol.* 56: 35-39.
50. Groff J., Zinkl J. 1999. Hematology and clinical chemistry of Cyprinid fish. Common carp and goldfish. *Vet. Clin. N. Am. Exot. Anim. Pract.* 2(3): 741-746.
51. Gupta K., Sarkar U., Bhardwaj S., Pal A. 2011. Condition factor, length–weight and length–length relationships of an endangered fish *Ompok pabda* (Hamilton 1822) (*Siluriformes: Siluridae*) from the river Gomti, a tributary of the river Ganga, India. *J. Appl. Ichthyol.* 27: 962–964.
52. Guzmán M., Bistoni M., Tamagnini L., Gonzalez R., 2004. Recovery of *Escherichia coli* in fresh water fish, *Jenynsia multidentata* and *Bryconamericus iheringi*. *Water Res.* 38: 2368-2374.
53. Ha M., Choi J., 2008. Effects of environmental contaminants on hemoglobin of larvae of aquatic midge, *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae): a potential biomarker for ecotoxicity monitoring. *Chemosphere.* 71: 1928-1936.

54. Hamid A., Mashhor M., Azizah S. 2015. Length-weight relationship and condition factor of fish populations in temengor reservoir: Indication of environmental health. *Sains Malaysiana*. 44 (1): 61-66.
55. Handy R., Sims D., Giles A., Campbell H., Musonda M. 1999. Metabolic trade-off between locomotion and detoxification for maintenance of blood chemistry and growth parameters by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during chronic dietary exposure to copper. *Aquat. Toxicol.* 47: 23-41.
56. Hannibal K., Bishop M. 2014. Chronic Stress, Cortisol Dysfunction, and Pain: A Psychoneuroendocrine Rationale for Stress Management in Pain Rehabilitation. *Phys Ther.* 94: 1816-1825.
57. Harmon, B. 1998. Avian heterophils in inflammation and disease resistance. *Poultry Science*. 77: 972-977.
58. Heim C., Ehlert U., Hellhammer D. 2000. The potential role of hypocortisolism in the pathophysiology of stress-related bodily disorders. *Psychoneuroendocrinology*. 25: 1–35.
59. Hoeger B., Kollner B., Dietrich D., Hitzfeld B. 2005. Water-borne diclofenac affects kidney and gill integrity and selected immune parameters in brown trout (*Salmo trutta f. fario*). *Aquat Toxicol.* 75: 53-64
60. Holmstrup M., Bindesbol A., Oostingh G., Duschl A., Scheil V., Kohler H. 2010. Interactions between effects of environmental chemicals and natural stressors: a review. *Sci Total Environ.* 408:3746-3762.
61. Hoq T., Hasan R., Haque N., Ashrafuzzaman M. 2015. The Effect of chromium on glucose content of freshwater fish, *Heteropneustes fossilis*. *A. J. Zool. Res.* 3: 1–3.

62. Iwama G. 1998. Stress in Fish. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 851: 304-310.
63. Iwanowicz D. 2011. Overview on the effects of parasites on fish health. Pp. 176–184. . Cipriano R., Bruckner A., Shchelkunov I. En *Proceedings of the Third Bilateral Conference between Russia and the United States. Bridging America and Russia with Shared Perspectives on Aquatic Animal Health*. Virginia. 176-184.
64. Jalali M, Ahmadifar E, Sudagar M, Takami G. 2009. Growth efficiency, body composition, survival and haematological changes in great sturgeon (*Huso huso* Linnaeus, 1758) juveniles fed diets supplemented with different levels of Ergosan. *Aquaculture Research*. 40: 804 a 809.
65. Jentoft S., Aastveit A., Torjesen P., Andersen O. Effects of stress on growth, cortisol and glucose levels in non-domesticated Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) and domesticated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 141: 353-358
66. Jill E. 2010. Hematology of Fish: WBC and RBC Cell Morphology. *IVIS*. 4: 13-17.
67. Katalay S., Parlak H. 2004. The effects of pollution on haematological parameters of *black goby* (*Gobius niger* L., 1758) in Foca and Aliaga Bays. *E.U. J. Fish. Aquat. Sci*. 21: 113-117.
68. Kawatsu H. 1978. Studies on the Anemia of Fish-IX. Hypochromic Microcytic Anemia of Crucian Carp Caused by Infestation with a Trematode, *Diplozoon nipponicum*. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*. 44(12): 1315-1319.

69. Keusch G., Douglas S., Ugurbil K. 1975. Intracellular bactericidal activity of leukocytes in whole blood for the diagnosis of chronic granulomatous disease of childhood. *J Infect Dis.* 131: 584-7.
70. Khanna D., Singh R., Kumar S., Matta G., Kumar D. 2007. A study of biotic and abiotic factors of Song River at Deheradun, Uttarakhand. *Env. Cons. J.* 8(3): 117-126.
71. Kim S., Rahimnejad S., Kim K. Lee K. 2013. Partial replacement of fish meal with *Spirulina pacifica* in diets for parrot fish (*Oplegnathus fasciatus*). *Turk J Fish Aquat Sc.* 13:197 – 204.
72. Kubilay A., Uluköy G. 2002. The effects of acute stress on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Turk. J. Zool.* 26: 249-254.
73. Kum C., Sekkin S. 2011. The immune system drugs in fish: immune function, immunoassay. Aral F., Dogu Z. *Recent Advances in Fish Farms in Tech. Croatia.* 169-216.
74. Kumolu J., Ndimele P. 2010. Length-weight relationships and condition factors of twentyone fish species in Ologe Lagoon, Lagos, Nigeria. *Asian J. Agric. Sci.* 2(4): 174-179.
75. Lacey J., Rodnick K. 2002. Important considerations for metahemoglobin measurement in fish blood: assay choice and storage conditions. *J. Fish Biol.* 60: 1155-1169.
76. Landini G., Schwantes A., Schwantes M. 2002. *Astyanax scabripinnis* (Pisces: *Characidae*) hemoglobins: structure and function. *Braz. J. Biol.* 62: 595-599.

77. Madhusoodhanan C., Sreeja K., Eldho T. 2016. Climate change impact assessments on the water resources of India under extensive human interventions. *Ambio*. 45: 725-741
78. Martinez M., Martinez L., Cordova R., Ramos E. 2009. Cortisol and glucose: reliable indicators of fish stress?. *Pan-Am J Aquatic Sci*. 4: 158-78.
79. Martínez M., Martínez L., Ramos R. 2009. Cortisol and Glucose: Reliable indicators of fish stress?. *Panamjas*. 4(2): 158-178.
80. Matson K., Tieleman B., Klasing K., 2006. Capture stress and the bactericidal competence of blood and plasma in five species of tropical birds. *Physiological and Biochemical Zoology*. 79: 556-564.
81. Merchant M., Roche C., Elsey R. Prudhomme J. 2003. Antibacterial properties of serum from the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Comp. Biochem. Physiol B*. 136: 505-513.
82. Misra C., Das B., Mukherjee S. 2009. Immune response, growth and survival of *Labeo rohita* fingerlings fed with levamisole supplemented diets for longer duration. *Aquac Nutr*,. 15: 356-365.
83. Misra C., Das B., Mukherjee S., Pattinak P. 2006. Effect of multiple injections of B-glucan on non-specific immune response and disease resistance in *Labeo rohita* fingerlings. *Fish Shellfish Immunol*. 20: 305-319.
84. Moss B. 2008. Water pollution by agriculture. *Phil. Trans. R. Soc. B*. 363: 659-666.
85. Mota V., Martins C., Eding E., Canário A., Verreth J. 2017. Cortisol and testosterone accumulation in a low pH recirculating aquaculture system for

- rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture research. 48: 3579 – 3588.
86. Mushtaq S., Mushtaq S., Balkhi M., Bhat F., Farooq I. 2016. Estimation of length-weight relationship and condition factor of *Crossocheilus diplochilus* (Heckel, 1838): A freshwater benthopelagic fish from Wular Lake in Kashmir Himalaya. Int. J. fish. aquat. stud. 4 (6): 522-525.
 87. Nikinmaa, M. 1992. How does environmental pollution affect red cell function in fish?. Aquat. Toxicol. 22: 227-238.
 88. Nnaji J., Uzairu A., Harrison G., Balarabe M. 2010. Effect of pollution on the physico-chemical parameters of water and sediments of river Galma, Zaria, Nigeria. Libyan Agric. Res. Cen. J. Intl., 1 (2): 115-122.
 89. Nordahl E., Rydengard V., Nyberg P., Nitsche D., Morgelin M., Malmsten M., Bjorck L., Schmidtchen A. 2004. Activation of the complement system generates antibacterial peptides. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101: 16879-16884.
 90. Ochsenbein A., Fehr T., Lutz C., Suter M., Brombacher F., Hengartner H., Zinkernagel R. 1999. Control of early viral and bacterial distribution and disease by natural antibodies. Science. 286:2156-2159.
 91. Ogamba E., Abowei J. 2012. Effects of Water Pollution on the Condition Factor, Mortality, Exploitation Ratio and Catch per Unit Effort of *Lagocephalus laevigatus* in Koluama area, Niger Delta Area, Nigeria. Res. J. Environ. Earth Sci. 4(11): 945-952.
 92. Örum I., Erdemil U. 2002. A study on blood parameters of *Capoeta trutta* (Heckel, 1843). J Biol Sci. 2(8): 508-511.

93. Padmalal D., Maya K., Sreebha S., Sreeja R. 2008. Environmental effects of river sand mining: a case from the river catchments of Vembanad lake, Southwest coast of India. *Environ Geol.* 54: 879-889.
94. Page M., Rowley A. 1983. A cytochemical, light and electron microscopical study of the leucocytes of the adult river lamprey, *Lampetra fluviatilis* (L. Gray). *J. Fish Biol.* 22: 503-517.
95. Pala E., Dey S. 2016. Microscopy and microanalysis of blood in a snake head fish, *Channa gachua* exposed to environmental pollution. *Microsc. Microanal.* 22(1), 39-47.
96. Palamuleni L., Akoth M. 2015. Physico-chemical and microbial analysis of selected borehole water in Mahikeng, South Africa. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 12: 8619-8630.
97. Parveen M., Bhat S., Haq S. 2013. Studies on physico-chemical characteristics of dal lake, Srinagar Kashmir. *Int. J. Curr. Res.* 5(6): 1352-1354.
98. Plumb J., Areechon N. 1990. Effect of malathion on humoral immune response of channel catfish. *Developmental and Comparative Immunology.* 14: 355-358.
99. Pratheepa V., Sukumaran N. 2014. Effect of *Euphorbia hirta* plant leaf extract on immunostimulant response of *Aeromonas hydrophila* infected *Cyprinus carpio*. *Peer. J.* 1476(2): 671-726.
100. Quezada P., Fajer E. 2017. The dietary effect of ulvan from *Ulva clathrata* on hematological-immunological parameters and growth of tilapia (*Oreochromis niloticus*). *J Appl. Phycol.* 29:423 – 431.

101. Quintana M., Pereira G. 2008. Estandarización de valores hematológicos de trucha arco iris (*Rainbow trout*). Cultura científica JDC. Boletín 3: 24 – 29.
102. Rao Y., Das B., Jyotirmayee P., Chakrabarti R. 2006. Effect of *Achyranthes aspera* on the immunity and survival of *Labeo rohita* infected with *Aeromonas hydrophila*. Fish Shellfish Immunol. 20(3): 263-273.
103. Ravichandra J. 2012. Influence of acute temperature stress on hemoglobin content in snakeheaded fish, *Channa punctatus* Godavari river. Nanded. Int. J. biomed. Adv. Res. 3: 823-827.
104. Ravichandran R., Madhavan D., Rengarajan R., Muthuvelu S. 2016. Impact of haematological characteristic alteration in tannery effluent treated fish *Channa Punctatus*. Int. J. Zool. Appl. Biosci. 1 (2): 72-75.
105. Regal A. 1946. Las minas incaicas. Revista de la Universidad Católica del Perú. 14 (1): 43-85.
106. Rhind S. 2012. Anthropogenic pollutants - an insidious threat to animal health and productivity?. Acta Vet. Scand. 54: 52-59
107. Ribas J., Zampronio A., Silva de Assis H. 2016. Effects of trophic exposure to diclofenac and dexamethasone on hematological parameters and immune response in freshwater fish. Environ. Toxicol. Chem. 35: 975-982.
108. Riggs A. 1979. Studies of the hemoglobins of Amazonian fishes. An overview. Comp. Biochem. Physiol. 62: 257-272.
109. Rodrigues J., Pinho R., Silva J., Ponte A., Sousa M., Silva J., Carvalho J. 2017. Appropriateness of the study of iron deficiency anemia prior to referral for small bowel evaluation at a tertiary center. World J. Gastroenterol. 23: 4444-4453.

110. Rodríguez A. 1995. Determinación de algunos aspectos hematológicos de *Oncorhynchus mykiss* (Salmonidae), en Cundinamarca, Colombia. Rev. Biol. Trop. 43(1-3): 283-288.
111. Rojas P. 2005. Efecto de la dieta sobre los niveles plasmáticos de insulina y glucagón en trucha “arco iris” (*Oncorhynchus mykiss*) y “dorada” (*Sparus aurata*) y caracterización del transportador de glucosa de dorada. Tesis Doctoral. Departamento de Fisiología. Facultad de Biología. Universidad de Barcelona. Barcelona – España 167 p.
112. Romero M., Uribe L., Sánchez J. 2011. Biomarcadores de estrés como indicadores de bienestar animal en ganado de carne. Biosalud. 10(1): 71-87.
113. Roszell L., Anderson R. 1997. Hydrogen peroxide production and bactericidal activity in pronephros phagocyte sub-populations from *Fundulus heteroclitus* following exposure to pentachlorophenol. Mar Environ. Res. 42: 191-194.
114. Sabae S., Mohamed F. 2015. Effect of environmental pollution on the health of *Tilapia* spp. from Lake Qarun. Glob Vet. 14 (3): 304-328.
115. Sahoo P., Das Mahapatra K, Saha J., Barat A., Sahoo M., Mohanty B. 2008. Family association between immune parameters and resistance to *Aeromonas hydrophila* infection in the Indian major carp, *Labeo rohita*. Fish Shellfish Immunol. 25: 163-160.
116. Salazar L., Estrella A., Oliveros A., Rojas E., Villalobos B., Lemus M. 2009. Paraquat and temperature affect nonspecific immune response of *Colossoma macropomum*. Environ. Toxicol. Pharmacol. 27(1): 321-326.

117. Scott G., Sloman K. 2004. The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquat. Toxicol.* 68: 369–392.
118. Selsted M., Martinez R. 1978. Lysozyme: primary bactericidin in human plasma serum active against *Bacillus subtilis*. *Infect. Immun.* 20: 782-791.
119. Shah S. 2006. Haematological parameters in tench, *Tinca tinca* after short term exposure to lead. *J. Appl. Toxicol.* 26 (3): 223-228.
120. Shivashranappa, Yalakpalli A. 2012. Physico-chemical cum biological characteristics & water quality index (wqi) of bhima river in Gulbarga District, Karnataka State, India. *Int. J. Egin. Reserch Dev.* 2(9): 10-16.
121. Silkin Y., Silkina E. 2005. Effect of hypoxia on physiological–biochemical blood parameters in some marine fish. *J. Evolut. Biochem. Physiol.* 41: 527-532.
122. Silva B., Martins M., Jatobá A., Buglione C., Vieira F., Pereira G., Jerónimo G., Seiffert W., Mouriño J. 2009. Hematological and immunological responses of Nile tilapia after polyvalent vaccine administration by different routes. *Pesq. Vet. Bras.* 29(11): 874-880.
123. Simonot D., Farrell A. 2007. Cardiac remodelling in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss Walbaum*) in response to phenylhydrazine-induced anaemia. *J. Exp. Biol.* 210: 2574-2584.
124. Sindermann C. 1980. Pollution effects on fisheries- potential management activities. *Helgol Wiss Meeresunters.* 33: 674-686
125. Soni P., Sharma S., Sharma S., Kumar S., Sharma K. 2006. A comparative study on the toxic effects of textile dye wastewaters (untreated and treated)

- on mortality and RBC of a freshwater fish *Gambusia affinis* (Baird and Gerard). J. Environ. Biol. 27 (4): 623-628.
126. Sueiro M., Palacios M. 2016. Immunological and health-state parameters in the Patagonian rockfish *Sebastes oculatus*. Their relation to chemical stressors and seasonal changes. Fish Shellfish Immunol. 48: 71-78.
127. Takahashi B., Montassier J., Takahashi L., Urbinati E. 2014. Proposed method for agglutinating antibody titer analysis and its use as indicator of acquired immunity in pacu, *Piaractus mesopotamicus*. Braz. J. Biol. 74(1): 238-242.
128. Takahashi B., Takahashi L., Pilarski F., Sebastião F., Urbinati E. 2013. Serum bactericidal activity as indicator of innate immunity in pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 65(6):1745-1751.
129. Trinder P. 1969. Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. J. clin. Path. 22: 158-161.
130. Val M., Correa A., Gil J., Francisco J. Gil M. 2006. Niveles séricos de hormonas esteroideas en poblaciones de trucha común (*salmo trutta fario*) como marcadores del grado de contaminación estrogénica de las aguas. III Congreso Internacional de Ingeniería Civil, Territorio y Medio Ambiente. Zaragoza. 20
131. Valenzuela A., Alveal K., Tarifeño E. 2002. Respuesta hematológica de truchas (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792) a estrés hipóxico agudo: Serie roja. Gayana. 66(2): 255-261.

132. Valon M., Valbona A., Eldores S., Fahri G., Fatmir C., Rahman F., Dhurata K. 2013. Physiological response of fish to water pollution in Sitnica river (Kosovo). *ISRJ*. 3: 2230-2239
133. Velisek J., Wlasow T., Gomulka P., Svobodova Z., Dobsikova R., Novotny L., Dudzik M. 2006. Effects of cypermethrin on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Veterinaria Medicina*. 51: 469–476
134. Venkataraman G., Sandhya P., Raju N., Girisha S., Vinay B. 2007. Physico-chemical characteristics and impact of aquatic pollutants on the vital organs of a freshwater fish *Glossogobius giuris*. *Res. J. Environ. Toxicol.* 1(1): 1-15.
135. Vliet V., Ludwig F., Zwolsman G., Weedon P., Kabat P. 2011. Global river temperatures and sensitivity to atmospheric warming and changes in river flow, *Water Resour. Res.* 47: 2544-2563.
136. Volpato G., Barreto R. 2001. Environmental blue light prevents stress in the fish Nile tilapia. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 34(8): 1041-1045.
137. Vörösmarty C., McIntyre P. Gessner M., Prusevich A., Green P. 2010. Global threats to human water security and river biodiversity. *Nature*. 467: 555-561.
138. Wang Z., Liu X., Jin L., Pu D., Huang J., Zhang Y. 2016. Transcriptome profiling analysis of rare minnow (*Gobiocypris rarus*) gills after waterborne cadmium exposure. *Comp. Biochem. Physiol. Part D Genomics Proteomics*. 19: 120-128.
139. Wendelaar B. 1997. The stress response in fish. *Physiol Rev.* 77: 591-625.
140. Witeska M. 2015. Anemia in Teleost fishes. *Bulletin of European Association of Fish Pathologists*. 35 (4): 148-160.

141. Yano T. 1996. The nonspecific immune system: Humoral defence. *In*: Iwama G. Eds. The fish immune system: organism, pathogen and environment. San Diego: Academic Press. 105-157.
142. Yildirim M., Lim C., Wan P., Klesius P. 2003. Growth performance and immune response of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) fed diets containing graded levels of gossypol-acetic acid. *Aquaculture*. 219: 751-768.
143. Zelikoff J. 1993. Metal pollution-induced immunomodulation in fish. *In*: Annual Review of Fish Diseases. Pergamon Press Ltd, UK. 305-325.
144. Zeraatpisheh F., Firouzbakhsh F., Khalili K. 2018. Effects of the macroalga *Sargassum angustifolium* hot water extract on hematological parameters and immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) infected with *Yersinia ruckeri*. *J Appl Phycol*. (18):1395 - 1404
145. Zhelev Zh., Mollova D., Boyadziev P. 2016. Morphological and hematological parameters of *Carassius gibelio* (pisces: cyprinidae) in conditions of anthropogenic pollution in southern bulgaria. Use of hematological parameters as biomarkers. *TJS*. 14: 1-15
146. Zorriehzakra M., Hassan M., Gholizadeh M., Saidi A. 2010. Study of some hematological and biochemical parameters of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry in western part of Mazandaran province, Iran. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*. 9(1): 185-198.
147. Zutshi B., Raghu S., Nagaraja R. 2010. Alteration in hematology of *Labeo rohita* under stress of pollution from Lakes of Bangalore, Karnataka, India. *Environ Monit Assess*. 168: 11–19.

ANEXO 1. PROTOCOLO DE LA PRUEBA DE ELISA

1. Preparación de las soluciones estándar:

Solución A. Solución madre 1 µg/ml (en frascos con tapa verde).

Solución B. Colocar 20 µl de solución A, junto con 980 µl de tampón EIA y mezclar = 20 ng/ml.

Solución C. Tomar 200 µl de la solución B, agregar a 1,8 ml de tampón EIA y mezclar = 2 ng / ml.

Solución D. Tome 200 µl de la solución C, agregue a 1.8 ml de tampón EIA y mezcle = 0.2 ng / ml.

2. Continuar con la preparación estándar siguiendo el Esquema I.

Esquema I. Preparación de estándares

Estándar	ng/ml	Buffer EIA (µl agregado)	Solución B (µl)	Solución C (µl)	Solución D (µl)
S ₀	0	1000	-	-	-
S ₁	0,04	800	-	-	200
S ₂	0,1	500	-	-	500
S ₃	0,2	-	-	-	1000
S ₄	0,4	800	-	200	-
S ₅	1	500	-	500	-
S ₆	2	-	-	1000	-
S ₇	10	500	500	-	-

- Determine la cantidad de pozos, que se usarán.
- Diluir el conjugado de la enzima de cortisol. Añadir 1µL del conjugado enzimático en 50 µl de volumen total de tampón EIA para cada pocillo ensayado. Para toda la placa, agregue 110 µl del conjugado enzimático en 5,5 ml de volumen total de tampón EIA. Mezcle la solución completamente.
- Agregue 50 µl de estándares (S) o desconocidos (U) (algunas muestras pueden requerir dilución) a los pocillos apropiados por duplicado.

6. Añada 50 μl del conjugado enzimático diluido a cada pocillo.
7. Mezcle sacudiendo la placa suavemente. Se puede usar un agitador de microplacas.
8. Cubra la placa con una película de plástico o cubierta de placa e incube a temperatura ambiente durante una hora. NOTA: Mantenga la placa alejada de corrientes de aire y fluctuaciones de temperatura.
9. Diluir el tampón de lavado concentrado con agua desionizada (es decir, 20 ml de tampón de lavado más 180 ml de agua desionizada). Mezcle bien.
10. Después de la incubación, vierta el contenido de la placa. Toca el contenido a fondo en una toalla limpia y sin pelusa.
11. Lave cada pocillo con 300 μl del wash buffer diluido. Repita para un total de tres lavados.
12. Agregue 150 μl de sustrato a cada pocillo. Use una pipeta multicanal para obtener mejores resultados. Mezcle sacudiendo la placa suavemente.
13. Incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos.
14. Agite suavemente la placa antes de tomar una lectura para garantizar un color uniforme en cada pocillo.
15. La placa se lee en un lector de microplacas a 620 nm.
16. Después de restar el fondo del sustrato de todos los valores de absorbancia, promedie todos los valores duplicados de absorbancia del pozo.
17. El promedio de sus dos valores S_0 ahora es su valor B_0 . (S_1 ahora se convierte en B_1 , etc.).
18. Luego, encuentre el porcentaje de la unión máxima (valor de % B/B_0). Para hacer esto, divida los promedios de cada valor de absorbancia estándar

(ahora conocido como B_1 a B_7) por el valor de absorbancia B_0 y multiplique por 100 para lograr porcentajes.

19. Grafica tu curva estándar trazando el $\%B/B_0$ para cada concentración estándar en el eje de ordenadas (y) contra la concentración en el eje de abscisas (x). Dibuje una curva usando una rutina de ajuste de curva (es decir, 4 parámetros o regresión lineal).
20. Divida los promedios de cada valor de absorbancia de la muestra por el valor B_0 y multiplique por 100 para lograr porcentajes.
21. Usando la curva estándar, la concentración de cada muestra se puede determinar comparando el $\%B/B_0$ de cada muestra con la concentración correspondiente del estándar de Cortisol.

ANEXO 2. FIGURAS DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN.



Figura 8. Lanzamiento de la red de pesca



Figura 9. Muestra de sangre



Figura 10. Sangre en tubo vacuteiner
con EDTA



Figura 11. Determinación de
hemoglobina en equipo Hemocue



Figura 12. Equipo Hemocue



Figura 13. Prueba Aglutinación bacteriana

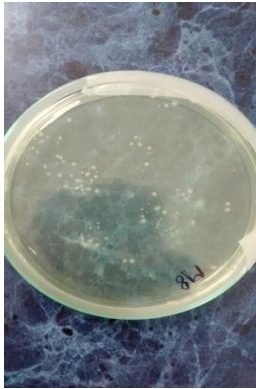


Figura 14. Conteo de UFC de *E. coli*.



Figura 15. Hematocrito

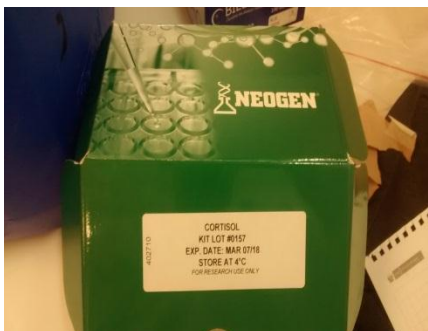


Figura 16. Kit para cortisol

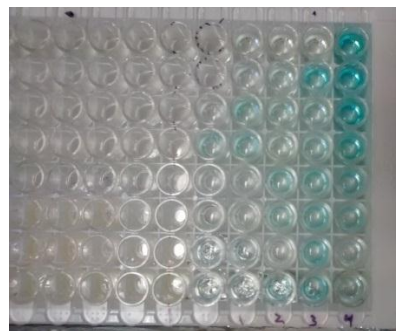


Figura 17. Placa de Elisa (cortisol)



Figura 18. *E. coli*. Inactivada



Figura 19. Muestra en vortex

ANEXO 4. CORRELACIÓN DE SPEARMAN

Rho de Spearman: Factor de co; [] Hb; Hematocrito; RBC; VCM; HCM; CHCM; GLUCOSA; ...

	Factor de condic	[] Hb	Hematocrito	RBC		
[] Hb	-0,025 0,886					
Hematocrito	-0,011 0,950	0,182 0,289				
RBC	-0,043 0,805	0,225 0,187	-0,316 0,061			
VCM	-0,025 0,887	0,102 0,554	0,966 0,000	-0,509 0,002		
HCM	-0,044 0,801	0,964 0,000	0,274 0,105	0,016 0,927		
CHCM	-0,042 0,806	0,654 0,000	-0,506 0,002	0,301 0,074		
GLUCOSA	0,115 0,503	0,026 0,878	-0,143 0,407	-0,009 0,958		
CORTISOL	0,235 0,167	0,008 0,962	-0,036 0,834	0,196 0,252		
% actv bact	-0,098 0,570	0,019 0,913	-0,001 0,998	0,227 0,183		
Titulo Ag-Ab	0,017 0,922	-0,166 0,333	-0,033 0,847	-0,156 0,363		
[]bacteriana	0,098	-0,019	0,001	-0,227		

	0,570	0,913	0,998	0,183
Tipo de Anemia	-0,052	0,457	-0,335	0,500
	0,764	0,005	0,046	0,002
O2 disuelto	0,436	0,125	0,557	-0,187
	0,008	0,469	0,000	0,274
Coliformes TT	-0,436	-0,125	-0,557	0,187
	0,008	0,469	0,000	0,274

	VCM	HCM	CHCM	GLUCOSA
HCM	0,229			
	0,180			
CHCM	-0,561	0,592		
	0,000	0,000		
GLUCOSA	-0,122	0,010	0,121	
	0,479	0,954	0,482	
CORTISOL	-0,068	-0,012	0,029	0,422
	0,695	0,944	0,867	0,010
% actv bact	-0,079	-0,034	0,078	0,252
	0,648	0,845	0,651	0,138
Titulo Ag-Ab	0,003	-0,108	-0,121	0,081
	0,985	0,532	0,483	0,641
[]bacteriana	0,079	0,034	-0,078	-0,252
	0,648	0,845	0,651	0,138
Tipo de Anemia	-0,404	0,346	0,456	0,128
	0,015	0,039	0,005	0,456
O2 disuelto	0,550	0,154	-0,257	0,167

	0,001	0,370	0,130	0,330
Coliformes TT	-0,550	-0,154	0,257	-0,167
	0,001	0,370	0,130	0,330

	<u>CORTISOL</u>	<u>% actv bact</u>	<u>Titulo Ag-Ab</u>	<u>[]bacteriana</u>
% actv bact	-0,099			
	0,565			
Titulo Ag-Ab	0,106	-0,144		
	0,539	0,403		
[]bacteriana	0,099	-1,000	0,144	
	0,565	*	0,403	
Tipo de Anemia	0,147	-0,175	-0,016	0,175
	0,391	0,308	0,926	0,308
O2 disuelto	0,413	-0,162	0,042	0,162
	0,012	0,345	0,808	0,345
Coliformes TT	-0,413	0,162	-0,042	-0,162
	0,012	0,345	0,808	0,345

	<u>Tipo de Anemia</u>	<u>O2 disuelto</u>
O2 disuelto	-0,149	
	0,387	
Coliformes TT	0,149	-1,000
	0,387	*

Contenido de la celda: Rho de Spearman
Valor p