

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

ESCUELA DE POSGRADO

**MAESTRÍA EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN GESTIÓN
AMBIENTAL**



**Residuos de tetraciclinas y genes de resistencia a tetraciclinas
en bacterias aisladas de *Ucides occidentalis* y *Litopenaeus
vannamei* en Tumbes, 2022-2023**

**Tesis para optar el grado académico de Maestro en Ciencias con
mención en Gestión Ambiental**

Autor: Wagner Paúl Campaña Maza

Tumbes, 2024

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

ESCUELA DE POSGRADO MAESTRÍA EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN GESTIÓN AMBIENTAL



Residuos de tetraciclinas y genes de resistencia a tetraciclinas en bacterias aisladas de *Ucides occidentalis* y *Litopenaeus vannamei* en Tumbes, 2022-2023

Tesis aprobada en forma y estilo por:

Dr. Auberto Hidalgo Mogollón

PRESIDENTE

Dr. Oscar Augusto Mendoza Neyra

SECRETARIO

Dra. Tessy Peralta Ortiz

VOCAL

Tumbes, 2024

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

ESCUELA DE POSGRADO MAESTRÍA EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN GESTIÓN AMBIENTAL



Residuos de tetraciclinas y genes de resistencia a tetraciclinas en bacterias aisladas de *Ucides occidentalis* y *Litopenaeus vannamei* en Tumbes, 2022-2023

Los suscritos declaramos que la tesis es original en su contenido y
forma

Br. Wagner Paúl Campaña Maza

AUTOR

Dr. Alberto Ordinola Zapata

ASESOR

Dra. Eneida Graciela Vieyra Peña

COASESORA

Dr. Héctor Alfredo Sánchez Suárez

COASESOR

Tumbes, 2024

Acta de revisión y defensa de tesis



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
Licenciada
Resolución del Consejo Directivo N° 155-2019-SUNEDU/CD
ESCUELA DE POSGRADO
Tumbes – Perú

"Año del Bicentenario, de la consolidación de nuestra Independencia, y de la Commemoración de las Heroicas Batallas de Junín y Ayacucho"

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

En Tumbes, a los ocho días de noviembre del dos mil veinticuatro, siendo las once horas y cinco minutos, se reunieron en el aula 2 de la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional de Tumbes los miembros del jurado calificador constituido con la resolución N° 345-2022/UNTUMBES-EPG-D del once de agosto del dos mil veinte dos, presidido por el Dr. AUBERTO HIDALGO MOGOLLON (presidente) e integrado por el Dr. OSCAR AUGUSTO MENDOZA NEYRA (secretario), la Dra. TESSY PERALTA ORTIZ (vocal) y el Dr. ALBERTO ORDINOLA ZAPATA (asesor), además, de la Dra. Enedia Graciela Vieyra Peña (coasesora) y el Dr. Héctor Sánchez Suarez (Coasesor).

Instalado el jurado, se procedió a la evaluación, deliberación y calificación del acto de la sustentación de tesis titulada: "**Residuos de tetraciclinas y genes de resistencia a tetraciclinas en bacterias aisladas de *Ucides occidentalis* y *Litopenaeus vannamei* en Tumbes, 2022-2023,**" presentado por el egresado: WAGNER PAUL CAMPAÑA MAZA para optar el grado académico de MAESTRO EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN GESTIÓN AMBIENTAL

Concluida la sustentación y absueltas las preguntas, por parte del sustentante y después de la correspondiente, deliberación el jurado, conforme a lo normado en el artículo N° 111 del Reglamento de Tesis de la Universidad Nacional de Tumbes, declara al sustentante aprobado, con el calificativo de **EXCELENTE**.

Por lo anterior, el sustentante está expedito para iniciar los trámites correspondientes y conducentes a la obtención del grado académico de MAESTRO EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN GESTIÓN AMBIENTAL, en conformidad con lo normado en la Ley Universitaria N° 30220, el Texto Único Ordenado del Estatuto, El Reglamento General, el Reglamento de Grados Títulos y el Reglamento de Tesis de la Universidad Nacional de Tumbes.

Siendo las doce horas y cero minutos, del mismo día, se dio por concluida la ceremonia académica, procediendo a firmar el acta en presencia del público asistente.

Tumbes, 08 de noviembre de 2024.

Dr. Auberto Hidalgo Mogollón
Presidente
DNI: 00250460
Código ORCID: 0000-0003-2921-4523

Dr. Oscar Augusto Mendoza Neyra
Secretario
DNI: 00201986
Código ORCID: 0000-0002-9637-6250

Dra. Tessa Peralta Ortiz vocal
DNI: 00239540
Código ORCID: 0000-0001-5907-7713

Dr. Alberto Ordinola Zapata
Asesor
DNI: 00326333
Código ORCID 0000-0002-9644-0531

Jurado de Tesis (03),
Asesor
Interesado
Coasesor (es)
Archivo (Director EPG).

2024.11.11. Tesis maestría de
Wagner Paúl Campaña
Maza.docx

por Wagner Paul Campaña Maza



Dr. Alberto Ordinola Zapata
<https://orcid.org/0000-0002-9644-0531>
Docente Asesor

Fecha de entrega: 11-nov-2024 10:12p.m. (UTC-0500)

Identificador de la entrega: 2488339803

Nombre del archivo: 2024.11.11._Tesis_maestría_de_Wagner_Paúl_Campaña_Maza.docx (16.16M)

Total de palabras: 25117

Total de caracteres: 136619

2024.11.11. Tesis maestría de Wagner Paúl Campaña
Maza.docx

INFORME DE ORIGINALIDAD



FUENTES PRIMARIAS

1	repositorio.untumbes.edu.pe Fuente de Internet	6%
2	Submitted to Universidad Nacional de Tumbes Trabajo del estudiante	1%
3	hdl.handle.net Fuente de Internet	1%
4	www.scielo.org.pe Fuente de Internet	<1%
5	www.satipo.com Fuente de Internet	<1%
6	revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe Fuente de Internet	<1%
7	nodal.ercot.com Fuente de Internet	<1%
8	repositorio.unap.edu.pe Fuente de Internet	<1%


Dr. Alberto Ordinola Zapata
<https://orcid.org/0000-0002-9644-0531>
Docente Asesor

9	ouci.dntb.gov.ua Fuente de Internet	<1 %
10	aprenderly.com Fuente de Internet	<1 %
11	zh.wikipedia.org Fuente de Internet	<1 %
12	Alejandro Fenollar Penadés. "Estudio de la transmisión de resistencias a antibióticos mediante métodos moleculares en el sector avícola y su implicación para la salud pública", Universitat Politecnica de Valencia, 2020 Publicación	<1 %
13	repositorio.upch.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
14	repositorio.unfv.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
15	www.revistas.unitru.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
16	Submitted to University of Queensland Trabajo del estudiante	<1 %
17	cdn.www.gob.pe Fuente de Internet	<1 %
18	atrium.lib.uoguelph.ca Fuente de Internet	<1 %


 Dr. Alberto Ordinola Zapata
<https://orcid.org/0000-0002-9644-0531>
 Docente Asesor

19 Submitted to Universidad Científica del Sur <1 %
Trabajo del estudiante

20 doczz.com.br <1 %
Fuente de Internet

21 Luis E. Aguirre Chanta, Héctor A. Sánchez-Suárez, Alberto Ordinola-Zapata. "Resistencia antibiótica en Vibrio spp aislados de camarón blanco Litopenaeus vannamei. Alternativas de tratamiento con extractos de Azadirachta indica y Origanum vulgare", Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú, 2021 <1 %
Publicación

22 Ana Montero Alonso. "Aplicación de métodos microbiológicos en la detección de residuos de antimicrobianos en la leche de oveja.", Universitat Politecnica de Valencia, 2004 <1 %
Publicación

23 boletin.invemar.org.co <1 %
Fuente de Internet

24 dspace.utb.edu.ec <1 %
Fuente de Internet

25 fritec.de <1 %
Fuente de Internet

26 www.ciad.mx <1 %
Fuente de Internet

microbeonline.com


Dr. Alberto Ordinola Zapata
<https://orcid.org/0000-0002-9644-0531>
Docente Asesor

27	Fuente de Internet	<1 %
28	repositorio.espam.edu.ec Fuente de Internet	<1 %
29	uees.edu.ec Fuente de Internet	<1 %
30	c.coek.info Fuente de Internet	<1 %
31	pumpjack.tamu.edu Fuente de Internet	<1 %
32	revistas.unne.edu.ar Fuente de Internet	<1 %
33	www.sma.df.gob.mx Fuente de Internet	<1 %
34	www.scielo.br Fuente de Internet	<1 %
35	Mohamed A. Farag, Somaia T. Mansour, Roua A. Nouh, Amira R. Khattab. "Crustaceans (shrimp, crab, and lobster): A comprehensive review of their potential health hazards and detection methods to assure their biosafety", <i>Journal of Food Safety</i> , 2022 Publicación	<1 %
36	studentsrepo.um.edu.my Fuente de Internet	<1 %


 Dr. Alberto Ordinola Zapata
<https://orcid.org/0000-0002-9644-0531>
 Docente Asesor

37	www.itu.int Fuente de Internet	<1 %
38	Diego Miguel Dasí Camaró. "Estudio del agua como fuente de entrada y dispersión de determinantes de resistencia a antibióticos al medio ambiente en el área metropolitana de Valencia y alrededores", Universitat Politecnica de Valencia, 2024 Publicación	<1 %
39	Submitted to University Of Tasmania Trabajo del estudiante	<1 %
40	repositorio.uach.mx Fuente de Internet	<1 %
41	repositorio.ug.edu.ec Fuente de Internet	<1 %
42	repository.javeriana.edu.co Fuente de Internet	<1 %
43	Submitted to University of Glasgow Trabajo del estudiante	<1 %
44	Submitted to University of Newcastle upon Tyne Trabajo del estudiante	<1 %
45	civilweb-spreadsheets.com Fuente de Internet	<1 %
46	www.biorxiv.org Fuente de Internet	<1 %


 Dr. Alberto Ordinola Zapata
<https://orcid.org/0000-0002-9644-0531>
 Docente Asesor

		<1 %
47	revistadigital.uce.edu.ec Fuente de Internet	<1 %
48	www.infectiologie.com Fuente de Internet	<1 %
49	Marinos Kintis, Mike Papadakis, Andreas Papadopoulos, Evangelos Valvis, Nicos Malevris, Yves Le Traon. "How effective are mutation testing tools? An empirical analysis of Java mutation testing tools with manual analysis and real faults", Empirical Software Engineering, 2017 Publicación	<1 %
50	cmbdata.gsfc.nasa.gov Fuente de Internet	<1 %
51	link.springer.com Fuente de Internet	<1 %
52	Submitted to Universidad Cesar Vallejo Trabajo del estudiante	<1 %
53	biblioimarpe.imarpe.gob.pe Fuente de Internet	<1 %
54	repositorio.uta.edu.ec Fuente de Internet	<1 %
55	Submitted to 95131 Trabajo del estudiante	 Dr. Alberto Ordinola Zapata https://orcid.org/0000-0002-9644-0531 Docente Asesor

		<1 %
56	Peralta Otero, Robert, Peralta Ortiz, Tessy, Ordinola-Zapata, Alberto. "Caracterización de cepas de <i>Vibrio</i> spp. biorremediadoras de petróleo aisladas de agua marina", Manglar, 2021 Fuente de Internet	<1 %
57	dspace.ucuenca.edu.ec Fuente de Internet	<1 %
58	journals.plos.org Fuente de Internet	<1 %
59	oldri.ues.edu.sv Fuente de Internet	<1 %
60	repositorio.lamolina.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
61	www.repositorio.usac.edu.gt Fuente de Internet	<1 %
62	Ana Espinel-Ingroff. "Mecanismos de resistencia a los antifúngicos: levaduras y hongos filamentosos", Revista Iberoamericana de Micología, 2008 Publicación	<1 %
63	buleria.unileon.es Fuente de Internet	<1 %



Dr. Alberto Ordinola Zapata
<https://orcid.org/0000-0002-9644-0531>
 Docente Asesor

64	revistas.imarpe.gob.pe Fuente de Internet	<1 %
65	www.revistas.una.ac.cr Fuente de Internet	<1 %
66	www.tdx.cat Fuente de Internet	<1 %
67	bioone.org Fuente de Internet	<1 %
68	ejnar.se Fuente de Internet	<1 %
69	eprints.uanl.mx Fuente de Internet	<1 %
70	renati.sunedu.gob.pe Fuente de Internet	<1 %
71	repositorio.urp.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
72	scielo.conicyt.cl Fuente de Internet	<1 %
73	up-rid.up.ac.pa Fuente de Internet	<1 %
74	www.zora.uzh.ch Fuente de Internet	<1 %


 Dr. Alberto Ordinola Zapata
<https://orcid.org/0000-0002-9644-0531>
 Docente Asesor

Excluir citas Activo

Excluir coincidencias < 15 words

Excluir bibliografía Activo



Dr. Alberto Ordinola Zapata
<https://orcid.org/0000-0002-9644-0531>
Docente Asesor

DEDICATORIA

A Dios Padre Celestial por haberme dado la vida y brindarme buena salud para continuar con mis estudios de posgrado, por ser el principal en acompañarme y guiarme en cada momento de mi vida y sobre todo en los momentos más difíciles que tuve que pasar; infinitas gracias Padre amado.

A mis padres Edilfredo Campaña Seminario y Emilaura Maza Cardoza por apoyarme en cada decisión que tomo y sobre todo por sus consejos que me brindan día a día.

A mis dos hermanos Ronald Iván Campaña Maza y Anthony Omar Campaña Maza por darme motivación y consejos a lo largo de esta nueva etapa profesional; de igual manera a mí prometida Nicole Alessandra Vergara Alfaro por su gran apoyo en la ejecución de mi tesis en la fase de laboratorio, así como por sus consejos y motivación que me permitió continuar con entusiasmo mi trabajo de investigación.

Wagner Paúl Campaña Maza

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional de Tumbes por el financiamiento otorgado al Proyecto de Investigación de canon y sobre canon petrolero titulado: “Contaminación por tetraciclinas y genes de resistencia en componentes bióticos y abióticos del manglar de Tumbes” aprobado mediante Resolución N° 1171-2021/UNTUMBES-CU, como parte del cual se realizó mi tesis; agradezco a dicho proyecto haber financiado en parte mi tesis.

A mi asesor Dr. Alberto Ordinola Zapata, por su apoyo desinteresado y recomendaciones durante la elaboración de proyecto, ejecución y redacción de resultados del presente trabajo de investigación; de la misma manera a mis coasesores Dra. Enedia Graciela Vieyra Peña y Dr. Héctor Alfredo Sánchez Suárez por sus recomendaciones y valiosas ideas que ayudaron a culminar con éxito la presente tesis.

A los miembros de mi jurado: Dr. Auberto Hidalgo Mogollón, Dr. Oscar Augusto Mendoza Neyra, y Dra. Tessy Peralta Ortiz, por sus aportes y sugerencias realizados para mejorar mi proyecto de tesis así como al informe final de tesis.

Al Dr. Marco Antonio Zapata Cruz, responsable del proyecto de investigación “Contaminación por tetraciclinas y genes de resistencia en componentes bióticos y abióticos del manglar de Tumbes”, por haber permitido desarrollar mi tesis dentro del proyecto que dirige, así como por brindarme su apoyo académico.

A los técnicos de laboratorio y personal que labora en los proyectos de investigación de los docentes Renacyt de la FIPCM: Ing. Nicole Alessandra Vergara Alfaro, Mg. Yeni Emperatriz Seminario Yamunaqué, Técnico Pedro Masías Ramírez, Mg. Robert Peralta Otero y Técnico Peter Baca Benites, por su desinteresado apoyo en la ejecución de mi tesis.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	xxiv
ABSTRACT	xxv
I. INTRODUCCIÓN.....	26
II. REVISIÓN DE LA LITERATURA	29
2.1 Bases teóricas.....	29
2.1.1. Ecosistema del manglar	29
2.1.2. Cangrejo del manglar (<i>Ucides occidentalis</i>)	29
2.1.3. Langostinos silvestres	30
2.1.4. Contaminantes en el manglar	30
2.1.5. Contaminación por antibióticos.....	31
2.1.6. Tetraciclinas.....	31
2.1.7. Límites máximos permisibles para residuos antibióticos en alimentos	32
2.1.8. Resistencia a antibióticos	33
2.1.9. Genes de resistencia a tetraciclinas	34
2.2. Antecedentes	34
III. MATERIALES Y MÉTODOS	39
3.1. Lugar y periodo de ejecución de la investigación	39
3.2. Tipo y diseño de investigación	39
3.3. Población y muestra de estudio	39
3.4. Lugar de recolección de las muestras.....	40
3.5. Recolección de la muestra de <i>Ucides occidentalis</i> y langostinos silvestres	40
3.6. Anestesia de los animales.....	41
3.7. Obtención de muestras de hemolinfa para cultivo bacteriano.....	41
3.8. Sacrificio de langostinos y cangrejos	41
3.9. Registro de características externas de langostinos y cangrejos	41
3.10. Obtención de muestras de tejidos sólidos para cultivo bacteriano.....	42
3.11. Obtención de muestras de tejidos para determinación de residuos antibióticos	42
3.12. Aislamiento de cepas cultivables de cangrejos y langostinos	42
3.13. Aislamiento y purificación de cepas bacterianas	42

3.14. Caracterización preliminar de cepas bacterianas.....	42
3.15. Identificación de cepas bacterianas	43
3.16. Determinación de residuos antibióticos.....	43
3.17. Determinación de resistencia antibiótica.....	43
3.18. Caracterización de ARGs de tetraciclina.....	48
3.19. Procesamiento de datos	49
3.19.1. Métodos de análisis de datos.....	49
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
4.1. Características externas de <i>Ucides occidentalis</i>	50
4.2. Características externas de langostinos silvestres.....	50
4.3. Parámetros físico químicos del agua en zonas de muestreo.....	51
4.4. Aislamiento en medio TCBS de cepas bacterianas aisladas de cangrejos del manglar y langostinos silvestres.....	54
4.5. Aislamiento en medio TSA de cepas bacterinas aisladas de cangrejos y langostinos silvestres.....	55
4.6. Caracterización molecular de cepas aisladas de <i>Ucides occidentalis</i>	57
4.7. Caracterización de cepas bacterianas seleccionadas de langostinos silvestres	61
4.8. Diámetro de inhibición de cepas bacterinas aisladas de <i>Ucides occidentalis</i> y langostinos silvestres.	65
4.9. Resistencia antibiotica de cepas bacterianas aisladas de cangrejos y langostinos silvestres.....	67
4.10. Porcentaje de resistencia antibiótica de cepas bacterinas en cangrejos y langostinos silvestres.....	72
4.11. Residuos de antibióticos en la parte comestible de cangrejos y langostinos silvestres.	75
4.12. Genes de resistencia en cepas bacterianas.....	76
V. CONCLUSIONES.....	80
VI. RECOMENDACIONES	81
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
ANEXOS	101

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Genes de resistencia antibiótica (ARGs) para tetraciclinas.....	34
Tabla 2. Antibióticos a utilizar en el ensayo de resistencia a antibióticos.....	44
Tabla 3. Puntos de corte para determinar la resistencia antibiótica en <i>Vibrio</i> spp.	45
Tabla 4. Puntos de corte para determinar la resistencia antibiótica en <i>Staphylococcus</i> spp	46
Tabla 5. Puntos de corte para determinar la resistencia antibiótica en Enterobacterias	47
Tabla 6. <i>Primers</i> utilizados en la PCR para detección de ARGs de tetraciclinas. .	48
Tabla 7. Programación del termociclador para amplificar fragmentos de ARGs de tetraciclinas	49
Tabla 8. Peso y ancho cefalotorácico (Media \pm DE) de <i>U. occidentalis</i> colectados en el manglar de Tumbes.....	50
Tabla 9. Peso y longitud (Media \pm DE) de langostinos silvestres (<i>Litopenaeus vannamei</i>) recolectados en el manglar de Tumbes.....	51
Tabla 10. Parámetros físico químicos del agua tomados en zonas de muestreo	52
Tabla 11. Cepas bacterianas aisladas de cangrejos del manglar en medio de cultivo TCBS.....	54
Tabla 12. Cepas bacterianas aisladas de langostinos silvestres en medio de cultivo TCBS.....	54
Tabla 13. Cepas aisladas de cangrejos de manglar en medio de cultivo TSA.....	56
Tabla 14. Cepas aisladas de langostinos silvestres en medio de cultivo TSA	56
Tabla 15. Identificación molecular de cepas bacterias aislada de <i>U. occidentalis</i> .	57
Tabla 16. Características morfológicas de las colonias seleccionadas de <i>Ucides occidentalis</i>	59
Tabla 17. Tinción de Gram, prueba de catalasa y oxidasa de cepas seleccionadas de <i>Ucides occidentalis</i>	60
Tabla 18. Identificación molecular de cepas bacterianas aisladas de langostinos silvestres	61
Tabla 19. Caracterización de la morfología de colonias seleccionadas de langostinos silvestres	63

Tabla 20. Tinción de Gram, pruebas de catalasa y oxidasa de cepas seleccionadas de langostino silvestres	64
Tabla 21. Diámetro de inhibición de cepas seleccionadas de <i>Ucides occidentalis</i>	65
Tabla 22. Diámetro de inhibición de cepas seleccionadas de langostinos silvestres	66
Tabla 23. Resistencia antibiótica en <i>Vibrio</i> spp. aislados de <i>Ucides occidentalis</i> ...	67
Tabla 24. Resistencia antibiótica de <i>Vibrio</i> spp. aislados de langostinos silvestres.....	69
Tabla 25. Resistencia antibiótica de <i>Staphylococcus</i> spp. y <i>Enterobacter</i> spp. aislados de <i>Ucides occidentalis</i>	70
Tabla 26. Resistencia antibiótica de <i>Staphylococcus</i> spp. y <i>Enterobacter</i> spp. aislados de langostinos silvestres	70
Tabla 27. Resistencia antibiótica de <i>Bacillus</i> spp. de cangrejos del manglar.....	71
Tabla 28. Porcentaje de resistencia antibiótica de cepas de <i>Vibrio</i> spp. aislados de <i>Ucides occidentalis</i>	72
Tabla 29. Porcentaje de resistencia antibiótica de <i>Vibrio</i> spp. aislados de langostinos silvestres	74
Tabla 30. Concentración de residuos antibióticos en tejidos de cangrejos del manglar y langostinos	75
Tabla 31. Genes de resistencia antibiótica de tetraciclinas en cepas seleccionadas de <i>Ucides occidentalis</i>	77
Tabla 32. Genes de resistencia antibiótica de tetraciclinas en cepas seleccionadas de langostinos silvestres	78
Tabla 33. Ubicación y coordenadas UTM de puntos de muestreo	102
Tabla 34. Residuos antibióticos en tejidos de cangrejos del manglar y langostinos silvestres	116

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Zonas de recolección de <i>Ucides occidentalis</i> y langostinos silvestres en el manglar de Tumbes: 1. Desembocadura del río Tumbes, 2. Puerto Pizarro y 3. El Bendito	40
Figura 2. Número de familias antibióticas a las que fueron resistentes las cepas de <i>Vibrio</i> spp. asilados de <i>Ucides occidentalis</i>	73
Figura 3. Número de familias antibióticas a las que fueron resistentes las cepas de <i>Vibrio</i> spp. aislados de langostinos silvestres	74
Figura 4. Proceso de recolección de cangrejos, langostinos silvestres y muestras de agua en el ecosistema manglar.....	109
Figura 5. Proceso de toma de parámetros biométricos en <i>Ucides occidentalis</i> ..	109
Figura 6. Toma de muestras de tejidos en cangrejos del manglar y langostinos.	109
Figura 7. Siembra de cepas en medios TCBS y TSA.....	110
Figura 8. Identificación de cepas utilizando coloración Gram.....	110
Figura 9. Pruebas bioquímicas de catalasa y oxidasa. a) Prueba de catalasa y b) Prueba de oxidasa	110
Figura 10. Siembra de cepas en medio Müeller Hinton y disposición de discos de antibióticos	111
Figura 11. Antibiogramas realizados en cepas de cangrejo (49 int) y langostino silvestre (Lang 55).....	111
Figura 12. Antibiogramas realizados en cepas de cangrejo del manglar (<i>Ucides occidentalis</i>)	112
Figura 13. Antibiogramas realizados en cepas de cangrejo del manglar (<i>Ucides occidentalis</i>)	112
Figura 14. Extracción de ADN.....	113
Figura 15. Gel de electroforesis con amplicones de fragmentos del gen 16S ARNr de cepas bacterianas aisladas en <i>U. occidentalis</i>	113
Figura 16. Gel de electroforesis con amplicones de fragmentos del gen 16S ARNr de cepas bacterianas aisladas en <i>L. vannamei</i>	113

Figura 17. Gel de migración de amplicones del gen *tetA* en cepas bacterianas de *U. occidentalis*. No se observan bandas fluorescentes, salvo las del marcador de peso molecular (MPM)114

Figura 18. Gel de migración de amplicones del gen *tetB* en cepas bacterianas de *U. occidentalis*. No se observan bandas fluorescentes, salvo las del marcador de peso molecular (MPM)114

Figura 19. Gel de migración de amplicones del gen *tetA* en cepas bacterianas de *L. vannamei*. No se observan bandas fluorescentes, salvo las del marcador de peso molecular (MPM)115

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Ubicación de zonas de muestreo	102
Anexo 2. Formulario de registro de datos de langostinos silvestres.....	103
Anexo 3. Formulario de registro de datos de <i>Ucides occidentalis</i>	105
Anexo 4. Procedimiento para la determinación de residuos antibióticos.....	107
Anexo 5. Recolección de muestras, toma de parámetros físico químico y obtención de tejidos.....	109
Anexo 6. Microbiología del trabajo de investigación.....	110
Anexo 7. Fase molecular del trabajo de investigación	113
Anexo 8. Residuos antibióticos en la parte comestible de cangrejos y langostinos silvestres	116

RESUMEN

La investigación buscó determinar el nivel de residuos antibióticos en tejidos de cangrejo de manglar (*Ucides occidentalis*) y de langostinos silvestres (*Litopenaeus vannamei*), así como, el tipo de genes de resistencia antibiótica (ARGs) de tetraciclinas en cepas bacterianas aisladas de los mismos. Se recolectaron 10 cangrejos y 10 langostinos silvestres de Puerto Pizarro, El Bendito y la desembocadura del río Tumbes. Los animales fueron sacrificados disminuyendo su temperatura corporal. De éstos se extrajeron muestras de hepatopáncreas, intestino y hemolinfa que se sembraron en agar tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS) y agar tripticosa soya (TSA), las cepas se purificaron en TSA. Se determinó la resistencia antibiótica de las cepas bacterianas frente a 12 antibióticos. También se identificaron molecularmente dichas cepas. Se determinó los residuos antibióticos en los tejidos de cangrejos del manglar y langostinos y la presencia de ARGs de tetraciclinas (*tetA*, *tetB*, *tetD* y *tetE*). Se lograron aislar de *Ucides occidentalis*, 53 cepas en TCBS y 93 cepas en TSA y de los langostinos, 64 cepas en TCBS y 68 en TSA. La mayoría de las cepas de *Vibrio* spp. aisladas de *U. occidentalis* fueron resistentes de uno a cuatro antibióticos. El 58,8% fueron resistentes a estreptomicina y 23,5% a fosfomicina. El 100% fueron sensibles al cloranfenicol y en menor proporción al florfenicol, tetraciclina y norfloxacin (94,1%) y a la oxitetraciclina (88,2%). Todas las cepas de *Vibrio* spp. aisladas de langostinos silvestres fueron resistentes de uno a tres antibióticos. Siendo el 92,9% resistentes a ampicilina y el 42,9% a estreptomicina. El 100% fueron sensibles al cloranfenicol y florfenicol, y 92,9% a gentamicina. Los niveles de residuos antibióticos de tetraciclinas en tejidos de ambos organismos, no excedieron el límite máximo de residuos (LMR) establecido en la legislación y no se observó ARGs de tetraciclinas *tetA*, *tetB*, *tetD* y *tetE*.

Palabras clave: resistencia antibiótica, residuos antibióticos, ARG, tetraciclina, *Ucides occidentalis*, *Litopenaeus vannamei*.

ABSTRACT

The research sought to determine the level of antibiotic residues in tissues of mangrove crab (*Ucides occidentalis*) and wild shrimp (*Litopenaeus vannamei*), as well as the type of antibiotic resistance genes (ARGs) of tetracyclines in bacterial strains isolated from them. Ten crabs and ten wild shrimp were collected from Puerto Pizarro, El Bendito and the mouth of the Tumbes River. The animals were sacrificed by lowering their body temperature. Samples of hepatopancreas, intestine and hemolymph were extracted from them and plated on thiosulfate citrate bile sucrose agar (TCBS) and trypticase soy agar (TSA). The strains were purified in TSA. The antibiotic resistance of the bacterial strains against 12 antibiotics was determined. They were also molecularly identified. Antibiotic residues in the tissues of mangrove crabs and shrimp were determined, as well as the presence of tetracycline ARGs (*tetA*, *tetB*, *tetD* and *tetE*). From *Ucides occidentalis*, 53 strains were isolated in TCBS and 93 strains in TSA, and from shrimp, 64 strains were isolated in TCBS and 68 in TSA. Most of the *Vibrio* spp. strains isolated from *U. occidentalis* were resistant to one to four antibiotics. 58.8% were resistant to streptomycin and 23.5% to fosfomicin. 100% were sensitive to chloramphenicol and to a lesser extent to florfenicol, tetracycline and norfloxacin (94.1%) and to oxytetracycline (88.2%). All *Vibrio* spp. strains isolated from wild shrimp were resistant to one to three antibiotics. 92.9% were resistant to ampicillin and 42.9% to streptomycin. 100% were sensitive to chloramphenicol and florfenicol, and 92.9% to gentamicin. The levels of antibiotic residues of tetracyclines in tissues of both organisms did not exceed the maximum residue limit (MRL) established in the legislation and no ARGs of tetracyclines *tetA*, *tetB*, *tetD* and *tetE* were observed.

Keywords: antibiotic resistance, antibiotic residues, ARG, tetracycline, *Ucides occidentalis*, *Litopenaeus vannamei*.

I. INTRODUCCIÓN.

La contaminación en la actualidad es un problema que amenaza a multitud de ecosistemas, siendo el ecosistema del manglar uno de los más afectados por ésta, en particular por diversos contaminantes algunos de ellos son bastantes nóveles, pero a su vez muy peligrosos como es el caso de los antibióticos y los genes de resistencia a antibióticos (ARGs), que pueden alterar el funcionamiento de los ecosistemas al modificar la composición y abundancia de las comunidades bacterianas e incluso amenazar la salud del ser humano que entra en contacto con dicho ecosistema al ingresar al mismo o al consumir sus productos.

Actualmente existe una gran preocupación por el uso de antibióticos (Oldenkamp et al., 2019); pues éstos alteran el equilibrio microbiano originando resistencia bacteriana (Grenni et al., 2018; León, 2015).

Los antibióticos se han usado para tratar infecciones bacterianas, así como para estimular el crecimiento y prevenir enfermedades infecciosas en la crianza de animales (Zhu et al., 2013); el consumo de antibióticos se ha acelerado, en el 2013 alcanzó las 320 000 toneladas a nivel mundial y se estima que el crecimiento seguirá y que para 2030 será 67% más que el registrado en 2015 (Blaser et al., 2021; Van et al., 2020; Zhang et al., 2015).

Entre las diferentes familias de antibióticos, las tetraciclinas son de las más usadas, ocupando el segundo lugar a nivel mundial (Xie et al., 2010), debido a su bajo costo y amplio espectro antibiótico (Xu et al., 2021). Entre las tetraciclinas, la oxitetraciclina es la más usada por la acuicultura a nivel mundial (Suzuki et al., 2019).

Las tetraciclinas generan un gran problema en el medio acuático porque se acumulan en los organismos y se integran a la cadena trófica, pudiendo afectar a la salud humana (Liu et al., 2019; Wilson et al., 2004), al seleccionar bacterias con resistencia antibiótica (Zhuang et al., 2021).

Los antibióticos originan presión selectiva en la comunidad bacteriana, haciendo que bacterias con genes que les permiten sobrevivir a ellos proliferen, estos genes se denominan genes de resistencia a antibióticos (ARGs); ellos mismos son considerados desde 2006, como poluentes emergentes, por su persistencia, capacidad de replicación y poder de propagación en el ambiente (Ruan et al., 2020; Zhao et al., 2020).

En la actualidad los antibióticos y ARGs se han reportado en casi todos los medios acuáticos, incluyendo el ecosistema del manglar (Hanna et al., 2018; Y. Li et al., 2017; Maiti & Chowdhury, 2013; Yuan et al., 2019; Zheng et al., 2021; Zhuang et al., 2021).

El manglar de Tumbes alberga especies hidrobiológicas que se explotan para el consumo humano, como son el cangrejo del manglar (*Ucides occidentalis*), y los langostinos silvestres (*Litopenaeus* spp. y *Farfantepenaeus* spp.) (Ordinola, 2022; Ordinola-Zapata et al., 2020), éstos están expuestos a diversos poluentes entre ellos posiblemente a residuos antibióticos y ARGs (Grande, 2020).

En investigaciones como las de De Silva et al. (2018), Liu et al. (2019) y Su et al. (2018), se ha hallado que langostinos de diversos países portan bacterias resistentes a antibióticos y ARGs, por lo que es posible que los langostinos de la región Tumbes, también puedan portarlos; por otro lado, si bien no se ha podido localizar investigaciones que hallan tratado de determinar la existencia de bacterias resistentes a antibióticos o de ARGs en el cangrejo del manglar (*U. occidentalis*), es probable que existan, pues se ha reportado en su especie hermana *Ucides cordatus*, la presencia de cepas bacterianas tales como *Vibrio* spp. en el Brasil (Vieira et al., 2004), incluso de cepas de *Vibrio* spp. y de *Escherichia coli* que fueron resistentes o multirresistentes a antibióticos (Carvalho et al., 2016), bacterias de estas especies también se han reportado como portadoras de ARGs (Li et al., 2022; Liu et al., 2019).

En base a lo antes expresado, es que es posible que existan residuos antibióticos y ARGs en recursos como el cangrejo del manglar y langostinos que son extraídos del manglar de Tumbes, los cuales podrían constituir un riesgo para los consumidores; en particular, y dado que en investigaciones previas se han reportado cepas de *Vibrio* resistentes a tetraciclinas; así como, por el hecho que en las empresas langostineras de la región se ha usado oxitetraciclina en los cultivos de langostino, cuyos efluentes son vertidos al manglar; es conveniente determinar

el nivel de residuos de tetraciclinas y de ARGs en bacterias presentes en tales recursos.

Por ello, esta investigación tuvo como objetivo:

Determinar el nivel de residuos antibióticos en tejidos de cangrejo de manglar (*Ucides occidentalis*) y de langostinos silvestres (*Litopenaeus vannamei*), así como el tipo de ARGs de tetraciclinas en cepas bacterianas aisladas de los mismos, en el manglar de Tumbes en el año 2022.

II. REVISIÓN DE LA LITERATURA

2.1. Bases teóricas.

2.1.1. Ecosistema del manglar

En el Perú el ecosistema del manglar se encuentra restringido a las regiones de Tumbes y Piura, siendo el departamento de Tumbes el que cuenta con la mayor extensión de manglar (aproximadamente 5000 ha frente a 300 ha en el departamento de Piura) (Ordinola-Zapata et al., 2020; Sernanp, 2017), en el manglar de Tumbes se halla también una zona protegida conocida como el Santuario Nacional Los Manglares de Tumbes (SNLMT), éste tiene una extensión de 2972 ha (Cisneros & Sunción, 2019). Los manglares de Tumbes son ecosistemas que están amenazados por actividades antrópicas como la agricultura y la acuicultura, así como por la contaminación originada por residuos sólidos y efluentes que introducen contaminantes químicos y biológicos al medio afectando la diversidad biológica de la zona (Morán & Hidalgo, 2018).

Los manglares son centros de diversidad única, siendo reconocidos como uno de los ecosistemas marino costeros más biodiversos del planeta (Imchen et al., 2018; Maiti & Chowdhury, 2013); en el caso del manglar de Tumbes, existe una variedad de organismos que juegan papeles importantes tanto ecológica como económicamente, tal es el caso del cangrejo del manglar y los langostinos (Ordinola-Zapata et al., 2020; Takahashi & Martínez, 2015).

2.1.2. Cangrejo del manglar (*Ucides occidentalis*)

El cangrejo del manglar se distribuye desde Baja California (México) hasta el estero San Pedro de Vice en Piura (Perú) (Alemán & Ordinola, 2017), su pesquería se realiza de forma artesanal en la región de Tumbes comercializándose vivos, siendo el crustáceo más explotado en el manglar; si bien no existe un registro exacto de su captura, se ha reportado que el año 2008 se capturó 143,8 t equivalente a 1,1 millones de ejemplares (Alemán et al., 2019; Ordinola et al., 2020).

Por otro lado, el cangrejo del manglar es una especie clave del ecosistema pues se encarga de reciclar el 84% de la materia orgánica procedente de la hojarasca, evitando el empobrecimiento de su suelo, adicionalmente ayuda a oxigenar el suelo anóxico del manglar favoreciendo la oxidación de la materia orgánica en el mismo (Ordinola-Zapata et al., 2018).

Los cangrejos del manglar pueden ser afectados por los contaminantes que se hallan en el manglar, especialmente en su sedimento, por ello pueden ser utilizados como biomonitores pues reúnen características que los hacen ideales, tales como: tener amplia distribución, longevidad y hábitos alimenticios sencillos; por ello, se les ha usado como biomonitores de contaminantes tales como metales pesados (Chuquimarca, 2015).

2.1.3. Langostinos silvestres

En el ecosistema del manglar se han encontrado especies de langostinos nativos tales como *Litopenaeus vannamei*, *L. stylirostris*, *Farfantepenaeus californiensis*, *F. occidentalis* y *F. brevirrostris* (Alfaro et al., 2014; Ordinola, 2022), la pesquería de langostinos silvestres es una de las que tiene mayor volumen de captura en Tumbes, en 2018 representó la segunda pesquería de invertebrados con mayor volumen de captura con 54,56 t; si bien es cierto que la pesquería de estos langostinos se da fundamentalmente en el mar, sus estadios post-larval y juvenil se hallan en los manglares (Takahashi & Martínez, 2015), por lo que están expuestos a los contaminantes que se puedan encontrar en el manglar.

2.1.4. Contaminantes en el manglar

Los manglares a nivel mundial son uno de los ecosistemas más amenazados por diversas causas, siendo una de ellas la contaminación por diversos poluentes (Maiti & Chowdhury, 2013) tales como: metales pesados (Nguyen et al., 2020), hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), poluentes orgánicos persistentes (POPs), productos farmacéuticos y de cuidado personal (PPCPs), compuestos disruptores endocrinos (EDCs) (Maiti & Chowdhury, 2013), microplásticos (Deng et al., 2021), e incluso antibióticos y genes de resistencia a antibióticos (ARGs) (Zheng et al., 2021), estos últimos considerados poluentes nóveles en los ecosistemas.

2.1.5. Contaminación por antibióticos

La producción de antibióticos se está incrementando, así los antibióticos veterinarios fabricados en EEUU pasaron de 90 t en 1950 a 130 000 t en 2009; en 2016, China fabricó 1 470 000 t de antibióticos para el mismo fin (Pan & Chu, 2016). El problema de la contaminación por antibióticos se relaciona tanto al alto volumen de antibióticos empleados como a que éstos son poco absorbidos cuando ingresan a los organismos de animales y seres humanos; se estima que entre el 25 a 75% de los antibióticos administrados son excretados sin ser metabolizados estos residuos antibióticos se acumulan en los cuerpos naturales receptores (Xu et al., 2020). El uso de antibióticos se espera seguirá creciendo, así Van Boeckel et al. (2015) estiman que la producción mundial de antibióticos para el 2030 aumentará en 67% respecto a su producción en 2010.

Entre los antibióticos más utilizados en el mundo se hallan los β -lactámicos y las tetraciclinas, respecto a este último grupo se ha reportado que el año 2013 se ha vertido en los cuerpos de agua lóticos de China, 12 000 t de tetraciclinas (Pan & Chu, 2016).

2.1.6. Tetraciclinas

Las tetraciclinas son un grupo de antibióticos integrado por antibióticos de origen natural, semi-sintético o sintético, se caracterizan por poseer cuatro anillos cíclicos, que les da su nombre: tetra = cuatro, ciclinas = ciclos (Markley & Wencewicz, 2018); estos antibióticos se emplean para tratar enfermedades originadas por bacterias susceptibles que atacan a la piel, al sistema urinario y genital, al sistema digestivo y respiratorio, entre otros (Lešnik et al., 2015).

La primera de las tetraciclinas se aisló de *Streptomyces aureofaciens* en 1945 y fue conocida como clortetraciclina, mientras que la segunda lo fue en 1948, la oxitetraciclina, uno de los antibióticos más empleados en veterinaria y acuicultura (Martínez, 2018; Varela-Mejías & Alfaro-Mora, 2018).

Las tetraciclinas ejercen su poder antibiótico bloqueando la síntesis de péptidos que ocurre en el ribosoma bacteriano, específicamente a nivel de la subunidad 30S del ribosoma (Varela-Mejías & Alfaro-Mora, 2018).

El mecanismo de actuación de las tetraciclinas se basa en bloquear la síntesis de proteínas en las bacterias; las tetraciclinas se ligan a la subunidad menor del ribosoma (30 S) impidiendo la síntesis de polipéptidos (Varela-Mejías & Alfaro-Mora, 2018).

A pesar de que las tetraciclinas son un grupo de antibióticos muy efectivos, ya se han reportado cepas bacterianas resistentes a ellas (Markley & Wencewicz, 2018). Debido al creciente problema de la resistencia antibiótica, diferentes países han establecido límites máximos permisibles para los residuos antibióticos (LMR) en alimentos.

2.1.7. Límites máximos permisibles para residuos antibióticos en alimentos

En diferentes legislaciones se han establecido límites máximos permisibles para la presencia de residuos antibióticos en alimentos; así se tiene en Perú la norma técnica sanitaria N° 120-Minsa/Digesa v.01. Norma sanitaria, que establece los límites máximos de residuos (LMR) de medicamentos veterinarios en alimentos de consumo humano (Digesa, 2016), en esta se ha establecido que en el músculo de peces y crustáceos para consumo humano, el límite máximo de residuos para clortetraciclina, tetraciclina y oxitetraciclina es de 200 µg/kg, mientras que en el caso de los mismos antibióticos más sus 4-epímeros, en músculo y piel es de 100 µg/kg. Por otro lado, la Unión Europea mediante su Informe EMEA/MRL/023/95 estableció que, en el caso de productos cárnicos, de manera general el límite máximo de residuos para oxitetraciclina, tetraciclina y clortetraciclina y sus 4-epímeros es de 100 µg/kg. Así también el *Codex Alimentarius* (Codex Alimentarius Commission, 2018), ha establecido para langostinos (específicamente en el caso de *P. monodon*) que el LMR para oxitetraciclina es de 200 µg/kg.

Como se observa, tanto en la legislación internacional como nacional se han establecido límites máximos para los residuos de tetraciclinas y otros antibióticos, esto debido a la posibilidad de que tales residuos originen resistencia antibiótica en bacterias patógenas para humanos.

2.1.8. Resistencia a antibióticos

La resistencia a antibióticos es un proceso de selección natural que se viene dando probablemente desde el surgimiento de los antibióticos naturales hace 2000 millones de años; algunos estudios han mostrado que cepas resistentes al antibiótico eritromicina existieron hace más de 800 millones de años; así también, se ha registrado en muestras de permafrost de 30 000 años de antigüedad obtenidas en Yukón (Canadá), genes de resistencia a tetraciclinas, β -lactámicos y glucopéptidos (D'Costa et al., 2011; Perry et al., 2016; Waglechner et al., 2021).

La resistencia moderna a los antibióticos se debe a la presión selectiva que ejercen el alto nivel de residuos antibióticos que se originan por el uso excesivo de los mismos (Grenni et al., 2018).

La resistencia a antibióticos se da a través de un conjunto de mecanismos entre los cuales se encuentran la modificación de la permeabilidad de la membrana celular que impide o disminuye el ingreso del antibiótico a la célula bacteriana, el desarrollo de bombas de eflujo para expulsar activamente al antibiótico del espacio intracelular al extracelular así como la síntesis de enzimas que hidrolizan a los antibióticos (Abrahamovich, 2018).

Todos los mecanismos de resistencia antibiótica se codifican en los genes que portan las bacterias en su ADN, los cuales a su vez se producen por mutaciones (Garza-Ramos et al., 2009), la resistencia antibiótica también puede ser adquirida cuando las bacterias obtienen genes de resistencia a antibióticos (ARGs) que no pertenecen a su propio genoma sino que provienen de otras bacterias, esto puede originar que algunas cepas bacterianas se conviertan en multirresistentes (Magiorakos et al., 2012).

2.1.9. Genes de resistencia a tetraciclinas

Según Abrahamovich (2018) y Liu et al. (2019), la resistencia a tetraciclinas se da a través de ARGs, existiendo una gran cantidad de ellos, los cuales se designan con un término inicial que representa a cuál de los antibióticos es resistente, así en el caso de los ARGs de resistencia a tetraciclina empiezan con *tet* y en el caso de los de oxitetraciclina con *otr*; se han identificado 46 genes de resistencia a tetraciclinas (tabla 1).

Tabla 1. Genes de resistencia antibióticos (ARGs) para tetraciclinas.

Antibiótico	Mecanismo	Gen de resistencia a antibiótico (ARG)	Cantidad de ARGs
Tetraciclinas	Bomba de eflujo	<i>tetA, tetA(P), tetB a tetL, tetV, tetY, tetZ, tet30, tet31, tet33, tet35, tet38, tet39, tet40, tet41, tet42, tet43, tet45, tcr3</i>	28
	Proteínas que protegen al ribosoma	<i>tet, tetB(P), tetM, tetO, tetQ, tetS, tetT, tetW, tet32, tet36, tet44</i>	11
	Enzimas que inactivan al antibiótico	<i>tetX, tet34 y tet37</i>	3
	Mecanismo desconocido	<i>tetU</i>	1
Oxitetraciclina	Bomba de eflujo	<i>otrB, otrC</i>	2
	Proteínas que protegen al ribosoma	<i>otrA</i>	1

2.2. Antecedentes

Los crustáceos pueden acumular en sus tejidos residuos de antibióticos y ARGs, en particular existen investigaciones que demuestran que esto es posible en el caso de langostinos, aunque no se han hallado investigaciones respecto a este caso en el cangrejo *U. occidentalis*, es posible que este también pueda acumularlos dado que se han hallado bacterias resistentes a antibióticos en tejidos de su especie hermana *U. cordatus*.

A continuación, se muestran algunas de las investigaciones al respecto, empezando por aquellas que han investigado residuos antibióticos y ARGs en langostinos y culminando con aquellas que han investigado resistencia bacteriana en *U. cordatus*:

Dinh et al. (2020), evaluaron la presencia de residuos de nueve familias de antibióticos, entre ellas de tetraciclinas, en 56 muestras de pescados y langostinos (*L. vannamei* y *P. monodon*), de cultivo y silvestres expendidos en Montreal (Canadá), utilizaron una metodología de extracción de cromatografía líquida de alto rendimiento (UHPLC) acoplado con espectrometría de masas en tándem. Los resultados indicaron que 38% de las muestras mostraron residuos de estos fármacos y 25% de las muestras tuvieron un nivel de residuos que superaban los límites máximos establecidos en la norma canadiense, entre 2 y 11% de las muestras mostraron residuos de tetraciclina (máximo: 36 µg/kg), 4-epi-oxitetraciclina (18 µg/kg) y oxitetraciclina (13 µg/kg).

Khan & Lively (2020), investigaron la presencia de residuos de antibióticos (oxitetraciclina, nitrofurantoina, cloranfenicol, fluoroquinolona) y sulfitos en langostinos importados en EEUU, usando kits comerciales de ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas). Encontraron que el 70% de las muestras tuvieron residuos de nitrofurantoina, 7% de oxitetraciclina y 17% de fluoroquinolona, pero ninguna tuvo de cloranfenicol, demostrando que los langostinos importados por EEUU portaban residuos de antibióticos.

Bahmani et al. (2020), evaluaron 360 muestras de carnes de diferentes aves, vacunos y organismos acuáticos (trucha y langostino) comercializados en Irán, para determinar la presencia de residuos de tetraciclinas mediante técnica de ELISA y confirmado posteriormente mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Encontraron que los langostinos tuvieron un nivel de residuos de tetraciclinas de 31,80 µg/kg, pero que estuvo por debajo de los límites máximos para residuos de este antibiótico establecido por el *Codex Alimentarius*, así también, en la confirmación de los niveles de residuos realizados con HPLC se observó que estos fueron ligeramente superiores comparados a los obtenidos con ELISA.

Sharma et al. (2021), determinaron la resistencia antibiótica de cepas bacterianas cultivables aisladas de langostinos frescos y cocidos, de la pesca en EEUU y de cultivo importados de otros países, que se expendieron en supermercados de Florida y Georgia. De los langostinos se obtuvieron muestras de tejidos, éstas fueron diluidas en agua peptonada al 0,1% y sembradas en placas con agar *plate count* (para recuento de bacterias aeróbicas) y con agar *violet red bile* (para coliformes), también en caldo tiotetraonato (para salmonelas), las bacterias fueron identificadas amplificando un fragmento de su gen 16S ARNr y buscando su secuencia con el software Blast, se realizó un ensayo de difusión en disco para determinar la resistencia de las cepas bacterianas frente a 10 antibióticos entre ellos tetraciclina; también, se detectaron ARGs usando reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real dirigida a 10 ARGs, entre ellos a un ARG de tetraciclinas (*tetA*). Los resultados mostraron que en langostinos frescos fue posible identificar 110 cepas de las cuales las más abundantes fueron de los géneros *Acinetobacter*, *Citrobacter*, *Morganella* y *Vibrio*, mientras que en los cocidos, *Morganella*, *Proteus* y *Lelliottia*. 20% de las cepas aisladas de langostinos cocidos y 8,1% de las aisladas de langostinos crudos fueron resistentes a tetraciclina, así también se halló, que 67% de las muestras de cepas de langostinos de cultivo y 12% de las de pesca portaron el gen *tetA*. Esto demostró que incluso los langostinos procedentes de la pesca, podían portar genes de resistencia a tetraciclinas.

Tsai et al. (2019), determinaron los residuos de antibióticos (cloranfenicol, quinolonas y metabolitos de nitrofuranos) en tejidos de langostinos y camarones de cultivo (*L. vannamei*, *P. monodon* y *Macrobrachium rosenbergii*), para ello se determinó los niveles de residuos antibióticos usando cromatografía líquida acoplado a espectrometría de masas en tándem (LC/MS-MS), encontraron que 7,55% de las muestras tuvieron residuos antibióticos; siendo que, *L. vannamei* tuvo 5,62 ng/g de enrofloxacin y 1,52 ng/g de flumaquina, mientras que *P. monodon* y *M. rosenbergii* tuvieron residuos de cloranfenicol.

Respecto a investigaciones relativas a ARGs en langostinos, se tiene:

Pham et al. (2018), determinaron la presencia de ARGs en efluentes de una langostinera de cultivo intensivo de *L. vannamei* en Vietnam. Aislaron cepas

bacterianas de estos langostinos en agar nutriente suplementado con sulfametoxazol, trimetoprim, ciprofloxacina, enrofloxacina y eritromicina. Se aislaron cepas de *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Acinetobacter* sp. multirresistentes a tetraciclinas, cloranfenicol, trimetoprim, sulfonamida, aminoglucósidos y β -lactámicos, de estas se extrajo ADN plasmídico que fue secuenciado para buscar ARGs. Se hallaron 41 genes de resistencia para los antibióticos señalados y específicamente en el caso de tetraciclinas se identificó *tetA*.

Su et al. (2018), evaluaron ARGs en langostinos cultivados en China, para ello realizaron extracción de ADN total del intestino de langostinos y se realizó análisis de PCR tiempo real con *primers* para 13 ARGs: *sul1*, *sul2*, *tetA*, *tetG*, *tetM*, *tetQ*, *cfp*, *cmiA*, *floR*, *qnrA*, *qnrB*, *qnrD* y *qnrS*. Se halló que los ARGs más abundantes correspondieron a los que confieren resistencia a sulfamidas: *sul1* y *sul2*, a fenicoles: *floR* y a quinolonas: *qnrD*, asimismo también siguieron en abundancia los que otorgaron resistencia a tetraciclinas: *tetA* y *tetG*.

Las investigaciones sobre residuos antibióticos en langostinos no se han dado aún en la región Tumbes y solo se ha localizado una sobre ARGs en la misma zona misma que pasa a detallarse:

Grande (2020), aisló y caracterizó ARGs para tetraciclinas en cepas bacterianas de *Vibrio* spp. en Tumbes (Perú), para ello obtuvo cepas de *Vibrio* spp. aisladas en investigaciones anteriores por el Organismo Nacional de Sanidad Pesquera (Sanipes), que fueron resistentes a los antibióticos ampicilina, tetraciclina y oxitetraciclina, trimetoprim/sulfametoxazol, enrofloxacina y cloranfenicol. También extrajo ADN para identificar ARGs mediante dos PCR múltiples, la primera dirigida a ARGs de cloranfenicol: *cat I*, *cat II*, *cat III* y *cat IV*, la segunda para ARGs de tetraciclinas: *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD*, *tetE*, *tetG* además de dos PCR simples para los ARGs de tetraciclinas: *tetM* y *tetS*. Los resultados indicaron que 76,46% de las cepas de *Vibrio* spp. fueron resistentes a ampicilina, 35,29% a tetraciclina y oxitetraciclina, 0,84% a trimetoprim/sulfametoxazol y 0,84% a enrofloxacina; pero ninguna fue resistente a cloranfenicol. Así también encontraron que el 95,87% de

las 42 cepas de *Vibrio* spp. resistentes a tetraciclinas portaban ARGs para las mismas, 26,83% de ellas portaban el gen *tetA*, y 69,04% el gen *tetB*.

Por otro lado, respecto a antibióticos y ARGs en *U. occidentalis* no se logró encontrar ninguna investigación publicada a nivel local ni mundial; sin embargo, sí existe al menos un estudio sobre cepas bacterianas resistentes a antibióticos en su especie hermana *U. cordatus*, la que se expone a continuación:

Carvalho et al. (2016), determinaron la presencia de cepas bacterianas resistentes a antibióticos en *U. cordatus* en Brasil. Tomaron muestras asépticas de músculo y vísceras, éstas fueron enriquecidas con agua peptonada y sembradas en medios selectivos para coliformes fecales, *Escherichia coli* y *Vibrio*. Las cepas fueron identificadas, así como su virulencia mediante PCR, su sensibilidad a 16 antibióticos (incluyendo tetraciclina) fue evaluada mediante ensayo de difusión en disco. Se obtuvo que las cepas de *E. coli* fueron mayormente resistentes a cloranfenicol y tobramicina (22% a 66%), y medianamente resistentes a tetraciclina (0% a 16%) mientras que *Vibrio* spp. mostró ser resistente a gentamicina (78 a 86%) pero sensible a tetraciclina.

La revisión de antecedentes indica que se han hallado residuos antibióticos y ARGs en langostinos, así como se han aislado bacterias resistentes a antibióticos en el cangrejo del manglar *U. cordatus*, por lo que es posible que también se hallen en langostinos silvestres, así como en el cangrejo del manglar *U. occidentalis*.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar y periodo de ejecución de la investigación

La presente investigación, en su fase de recolección de muestras para aislamiento de bacterias en tejidos de cangrejo y langostino se llevó a cabo de octubre de 2022 a enero de 2023; para el caso de los muestreos realizados en la colecta de ejemplares; la ejecución y obtención de resultados se desarrolló en los Laboratorios de Microcultivos y Biología Molecular de la Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar de la Universidad Nacional de Tumbes, ubicada en la Calle Los Ceibos S/N de Villa de Puerto Pizarro en el distrito, provincia y departamento de Tumbes, misma que tiene como coordenadas geográficas en UTM E-567387 y N-9612554.

3.2. Tipo y diseño de investigación

La investigación fue de tipo básica cuantitativa y en cuanto a su diseño de investigación fue descriptiva.

3.3. Población y muestra de estudio

Población. La población fueron los ejemplares de cangrejo del manglar (*Ucides occidentalis*) de tamaño comercial presentes en el manglar de Tumbes en el año 2022 y 2023, así como todos los ejemplares de langostinos silvestres juveniles o adultos de la especie *Litopenaeus vannamei* que se hallaron en la misma zona en dicho lapso.

Muestra. La muestra estuvo representada por 30 ejemplares de cangrejos del manglar (*Ucides occidentalis*) y 30 de langostinos silvestres (*Litopenaeus vannamei*) las mismas que fueron seleccionadas al azar de tres zonas del manglar.

Muestreo. Se realizó durante los meses de octubre a diciembre de 2022 para los cangrejos del manglar *Ucides occidentalis* y en enero de 2023 para los langostinos *Litopenaeus vannamei* silvestres.

3.4. Lugar de recolección de las muestras.

Las muestras fueron recogidas en tres zonas del manglar de Tumbes: Puerto Pizarro, El Bendito y desembocadura del río Tumbes, donde se recolectaron 10 ejemplares de *U. occidentalis* y 10 langostinos silvestres *L. vannamei* en cada zona de muestreo (figura 1 y tabla 33 del anexo 1). Además de ello, se registraron las coordenadas geográficas usando un GPS marca Garmin modelo Etrex 10, la fecha del muestreo, y fotografías de la zona. Por último, se registraron los parámetros físicos químicos del agua del lugar de recolección: temperatura, salinidad, pH, oxígeno disuelto, nitratos, nitritos, fosfatos y alcalinidad.

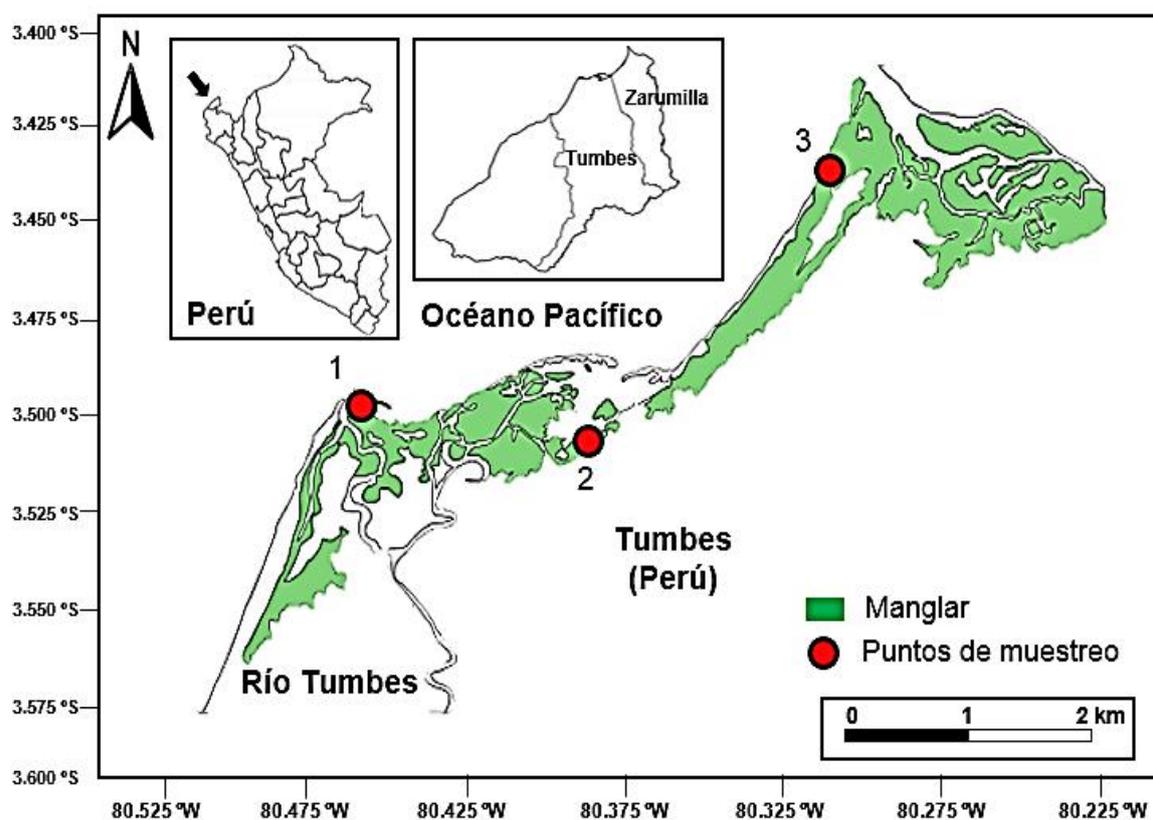


Figura 1. Zonas de recolección de *Ucides occidentalis* y langostinos silvestres en el manglar de Tumbes: 1. Desembocadura del río Tumbes, 2. Puerto Pizarro y 3. El Bendito.

3.5. Recolección de la muestra de *Ucides occidentalis* y langostinos silvestres

En cada punto de muestreo se recolectaron 10 ejemplares de cangrejos y 10 de langostinos. Un extractor especializado (cangrejero) recolectó los 10 ejemplares de cangrejos del manglar, que tuvieron talla comercial (ancho cefalotorácico ≥ 65 mm), los cangrejos fueron lavados y colocados en bolsas de malla anchovetera (“jicras”);

por otro lado, un pescador se encargó de capturar los 10 ejemplares de langostinos silvestre (*L. vannamei*), éstos fueron transportados en baldes con agua de la zona de recolección y con aireación proporcionada por un aireador portátil, hasta el Laboratorio de Microcultivos de la FIPCM para su procesamiento.

3.6. Anestesia de los animales

Los cangrejos y langostinos fueron anestesiados buscando evitar el menor dolor posible siguiendo las recomendaciones de la *Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals* (RSPCA, 2016); que precisa que se debe reducir la temperatura corporal de los invertebrados hasta llevarlos a la anestesia y finalmente la muerte bajando la temperatura de los ejemplares hasta los 4 °C.

3.7. Obtención de muestras de hemolinfa para cultivo bacteriano

Se obtuvieron muestras de hemolinfa de los langostinos y cangrejos, en el caso de los langostinos se obtuvo una muestra de 0,1 ml de hemolinfa del seno ventral con una jeringa de 1 ml precargada con 0,1 ml de citrato de sodio al 10% a temperatura de 4 °C; en el caso de los cangrejos se tomó muestra de 1 ml de hemolinfa de la articulación entre el carpo y propodio de una de sus quelas, para lo que se empleó una jeringa de 5 ml precargada con 1 ml de citrato de sodio al 10% a temperatura de 4 °C.

3.8 Sacrificio de langostinos y cangrejos

Luego de haber extraído la hemolinfa, se procedió a sacrificar a los cangrejos y langostinos para lo cual se redujo su temperatura por debajo de 4 °C, en el caso de los cangrejos a -15 °C, para que ocurriera su muerte.

3.9. Registro de características externas de langostinos y cangrejos

Los ejemplares muertos fueron pesados en una balanza gramera marca Ohaus modelo AX8201; además de ello se tomaron sus principales medidas de longitud (longitud total en langostinos, ancho cefalotorácico en cangrejos), también se determinó su sexo, presencia de erosiones, coloración y se tomó el registro fotográfico de los mismos, los datos fueron registrados en los formularios 1 y 2 del anexo.

3.10. Obtención de muestras de tejidos sólidos para cultivo bacteriano

En esta etapa, se procedió a extraer un fragmento de hepatopáncreas e intestino de los langostinos (alrededor de 0,1 g), cada uno de ellos fue colocado en un microtubo de 1,5 ml, luego fueron triturados con maceradores de acero esterilizados y se les adicionó solución salina (2,5% de NaCl) hasta alcanzar 1 ml. De cada una de éstas se realizaron diluciones de 10^0 a 10^{-3} .

3.11. Obtención de muestras de tejidos para determinación de residuos antibióticos

Los ejemplares de cangrejo y langostinos muertos fueron disecados, de cada uno de ellos se tomó al menos 2 g de sus partes blandas que fueron colocados en tubos falcon de 50 ml donde fueron triturados hasta obtener una masa homogénea.

3.12. Aislamiento de cepas cultivables de cangrejos y langostinos

En el caso de cada muestra de hemolinfa, se sembró 100 μ l de la solución de hemolinfa y anticoagulante en su respectiva placa petri conteniendo medio agar tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS), otros 100 μ l fueron sembrados en agar tripticasa soya (TSA). Las placas petri fueron selladas con cinta parafilm y se incubaron por 24 h a 37 °C.

Las muestras de hepatopáncreas e intestino, fueron diluidas de 10^{-1} hasta 10^{-3} ; de las diluciones 10^{-2} y 10^{-3} , se tomó 100 μ l que fueron sembrados en medio TCBS, otros 100 μ l se sembraron en medio TSA.

3.13. Aislamiento y purificación de cepas bacterianas

Las cepas más representativas que crecieron en TCBS y TSA fueron aisladas y subcultivadas en TSA, hasta la obtención de monocultivos bacterianos. Las cepas puras se conservaron a -15 °C en microtubos de 1,5 ml con 15% de glicerol, hasta el momento de su uso.

3.14. Caracterización preliminar de cepas bacterianas

Las cepas puras se caracterizaron preliminarmente mediante pruebas de catalasa, oxidasa y tinción de Gram.

3.15. Identificación de cepas bacterianas

De las cepas purificadas se extrajo ADN usando el kit de extracción comercial Presto Soil DNA Extraction Kit, luego se realizó amplificación de un fragmento del gen 16S ARNr, el mismo que fue enviado a secuenciar a una empresa del extranjero. Las secuencias fueron comparadas con las disponibles en la base de datos de GenBank y SILVA, utilizando el software en línea Nucleotide Blast. Se declaró identidad a nivel de especie, cuando su porcentaje de identidad fue $\geq 99\%$ y a nivel de género cuando su porcentaje de identidad fue $\geq 97\%$ pero menor a 99% .

3.16. Determinación de residuos antibióticos

La determinación de la concentración de residuos de antibióticos se realizó con un kit comercial cuantitativo basado en ensayo de ELISA para tetraciclinas de la marca Elabscience (N° de catálogo E-FS-E064) en un espectrofotómetro lector de microplacas de ELISA marca Biosan modelo Hipo MPP-96 con capacidad para realizar lecturas de absorción a una longitud de onda de 450 nm.

La determinación de los residuos se hizo siguiendo las instrucciones del fabricante del kit, como se aprecia en el anexo 3.

3.17. Determinación de resistencia antibiótica

Se determinó la resistencia antibiótica de las cepas bacterianas mediante la técnica de difusión en disco. Las cepas se cultivaron en medio líquido, en caldo tripticosa soya (TSB), su concentración se igualó a la del estándar 0,5 de Mac Farland (equivalente a $1,5 \times 10^8$ UFC/ml), luego se sembraron en agar Mueller Hinton.

En las placas petri en que sembraron las cepas bacterianas sembradas, se colocaron discos de antibióticos comerciales (que incluyeron tetraciclina), conforme a los utilizados por Aguirre (2019) (tabla 2):

Tabla 2. Antibióticos a utilizar en el ensayo de resistencia a antibióticos.

Familia antibiótica	Antibiótico	Clave	Cantidad de antibiótico por disco (µg)
Aminoglucósidos	Gentamicina	Gen	10
	Estreptomina	Str	10
Fenicoles	Cloranfenicol	Clor	30
	Florfenicol	Flo	25
Fosfonatos	Fosfomicina	Fos	50
Penicilinas	Ampicilina	Amp	10
Quinolonas	Ácido nalidíxico	Nal	30
	Enrofloxacin	Enro	5
	Norfloxacin	Nor	10
Tetraciclinas	Oxitetraciclina	Otc	30
	Tetraciclina	Tet	30
Macrólidos	Azitromicina	Azm	15

Las placas fueron incubadas a 37 °C por 24 horas, posteriormente se midió el diámetro de los halos de inhibición de cada antibiótico. Para declarar la resistencia antibiótica en *Vibrio* spp. (resistente, sensible e intermedia), se comparó la medida del diámetro del halo de inhibición con los puntos de corte que se observan en la tabla 3 y que corresponden a los utilizados por Aguirre et al. (2021).

Tabla 3. Puntos de corte para determinar la resistencia antibiótica en *Vibrio* spp.

Antibiótico	Código	Dosis en cada disco (µg)	Puntos de corte (mm) para determinación de sensibilidad en <i>Vibrio</i> spp.		
			Sensible	Intermedio	Resistente
<i>Aminoglucósidos</i>					
Gentamicina	Gen	10	≥15	13-14	≤12
Estreptomina*	Str	10	≥17	13-16	≤12
<i>Fenicoles</i>					
Cloranfenicol	Clor	30	≥18	13-17	≤12
Florfenicol	Flo	25	≥18	13-17	≤12
<i>Fosfonatos</i>					
Fosfomicina	Fos	50	≥20	17-19	≤16
<i>Penicilinas</i>					
Ampicilina	Amp	10	≥17	14-16	≤13
<i>Quinolonas</i>					
Ácido nalidíxico	Nal	30	≥19	14-18	≤13
Enrofloxacin	Enro	5	≥21	16-20	≤15
Norfloxacin	Nor	10	≥17	13-16	≤12
<i>Macrólidos</i>					
Azitromicina**	Azm	15	≥17	13-16	≤12
<i>Tetraciclinas</i>					
Tetraciclina	Tet	30	≥19	15-18	≤14
Oxitetraciclina	Otc	30	≥19	15-18	≤14

* Fijado en base a datos de Baron et al. (2016) tomados de Clinical and Laboratory Standard Institute [CLSI] (2016).

** Fijado tomando datos de teniendo en cuenta que no se han fijado límites para azitromicina pero según indica CLSI (2016), eritromicina puede servir para fijar la sensibilidad a azitromicina (datos tomados de Baron et al. (2016)).

También se comparó la resistencia antibiótica de cepas que fueron aisladas y correspondieron a *Staphylococcus* spp. y *Enterobacter* spp., éstos fueron comparados con sus respectivos puntos de corte que se observan en las tablas 5 y 6 que fueron establecidos por el Clinical and Laboratory Standard Institute [CLSI] (2020).

Por otra parte, dado que en el caso de las cepas de *Bacillus* spp., no se han establecido puntos de corte en la normatividad internacional, se asumieron los puntos de corte correspondientes a *Staphylococcus*, tal como lo hizo Adamski et al. (2023).

Tabla 4. Puntos de corte para determinar la resistencia antibiótica en *Staphylococcus* spp.

Antibiótico	Código	Dosis en cada disco (µg)	Puntos de corte (mm) para determinación de sensibilidad en <i>Staphylococcus</i> spp		
			Sensible	Intermedio	Resistente
<i>Aminoglucósidos</i>					
Gentamicina	Gen	10	≥15	13-14	≤12
Estreptomina*	Str	10	≥9	7-9	≤7
<i>Fenicoles</i>					
Cloranfenicol	Clor	30	≥18	13-17	≤12
Florfenicol	Flo	25	≥18	13-17	≤12
<i>Fosfonatos</i>					
Fosfomicina	Fos	50	ND	ND	ND
<i>Penicilinas</i>					
Ampicilina**	Amp	10	≥15	12-14	≤11
<i>Quinolonas</i>					
Ácido nalidíxico	Nal	30	ND	ND	ND
Enrofloxacina*	Enro	5	≥22	22-17	≤17
Norfloxacina	Nor	10	ND	ND	ND
<i>Macrólidos</i>					
Azitromicina	Azm	15	≥18	14-17	≤13
<i>Tetraciclinas</i>					
Tetraciclina	Tet	30	≥19	15-18	≤14
Oxitetraciclina*	Otc	30	≥18	15-18	≤15

*Tomado de los puntos de corte de Petrovski et al. (2015)

** Los puntos de corte para la ampicilina fueron retirados del CLSI (2010).

Tabla 5. Puntos de corte para determinar la resistencia antibiótica en *Enterobacterias*.

Antibiótico	Código	Dosis en cada disco (µg)	Puntos de corte (mm) para determinación de sensibilidad en <i>Enterobacter</i> spp.		
			Sensible	Intermedio	Resistente
<i>Aminoglucósidos</i>					
Gentamicina	Gen	10	≥15	13-14	≤12
Estreptomina	Str	10	≥15	12-14	≤11
<i>Fenicoles</i>					
Cloranfenicol	Clor	30	≥18	13-17	≤12
Florfenicol	Flo	30	ND	ND	ND
<i>Fosfonatos</i>					
Fosfomicina*	Fos	50	≥15	---	<15
<i>Penicilinas</i>					
Ampicilina	Amp	10	≥17	14-16	≤13
<i>Quinolonas</i>					
Ácido nalidíxico	Nal	30	≥19	14-18	≤13
Enrofloxacina**	Enro	5	≥17	13-16	≤12
Norfloxacina**	Nor	10	≥17	13-16	≤12
<i>Macrólidos</i>					
Azitromicina	Azm	15	≥13	---***	≤12
<i>Tetraciclinas</i>					
Tetraciclina	Tet	30	≥15	12-14	≤11
Oxitetraciclina**	Otc	30	≥15	12-14	≤11

*Tomado en base a los puntos de corte de *E. coli* en Mughal et al. (2023), puesto que Maraki et al. (2009) señala que se puede usar los puntos de corte de *E. coli* para otras gramnegativas.

** Tomado en base a los puntos de corte para enterobacteriales en Aidaros et al. (2022).

*** En la tabla original, no existe un rango para determinar el estado de sensibilidad intermedia para azitromicina.

Luego se calculó el índice de resistencia múltiple a antibióticos (IRMA) de cada cepa, mediante la fórmula:

$$IRMA = NAR/NAT$$

Donde:

NAR = Número de antibióticos a los que resiste la cepa

NAT= Número total de antibióticos utilizados en el antibiograma

Se determinó también si la cepa fue multirresistente para lo cual se verificó si cumplió con el criterio de haber sido resistente a por lo menos un antibiótico correspondiente a una familia en al menos tres familias antibióticas diferentes.

Las cepas que mostraron resistencia o multirresistencia fueron conservadas en refrigeración en tres microtubos con caldo TSB suplementado con 15% de glicerol.

3.18. Caracterización de ARGs de tetraciclinas

Se evaluó la posible presencia de ARGs de tetraciclinas (*tetA*, *tetB*, *tetD* y *tetE*), en las cepas bacterianas aisladas de cangrejos y langostinos silvestres, dado que ninguna de las cepas aisladas mostró resistencia a las tetraciclinas sino más bien sensibilidad; se optó por seleccionar 48 cepas, tomando como criterio aquellas cepas que fueron identificadas molecularmente y aquellas que pudieron ser reactivadas y crecieron en el medio, lo que permitió obtener su ADN. Para ello, se utilizó la metodología propuesta por Jang et al. (2018) y Jang et al. (2014), en breve, se extrajo ADN de las cepas bacterianas y se realizó reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los *primers* que se indican en la tabla 6, y que correspondieron a los cuatro genes de resistencia (ARGs) a tetraciclinas más frecuentes.

Tabla 6. *Primers* utilizados en la PCR para detección de ARGs de tetraciclinas.

Gen	<i>Primers</i>	Secuencia (5'-3')	Temperatura de hibridación (°C)	Tamaño de amplicón (pb)	Referencia
<i>tetA</i>	<i>Forward</i>	GCTACATCCTGCTTGCCTTC	60,9*	210	Ng et al. (2001)
	<i>Reverse</i>	CATAGATCGCCGTGAAGAGG			
<i>tetB</i>	<i>Forward</i>	GGTTGAGACGCAATCGAATT	52,9	206	Mao et al. (2015)
	<i>Reverse</i>	AGGCTTGGAATACTGAGTGTA			
<i>tetD</i>	<i>Forward</i>	TGAACAGCATTCTCGCTATCAA	52,6	169	Ng et al. (2001)
	<i>Reverse</i>	CCACTTGGTATAACCCGCTTTA			
<i>tetE</i>	<i>Forward</i>	AAACCACATCCTCCATACGC	63,7*	278	Ng et al. (2001)
	<i>Reverse</i>	AAATAGGCCACAACCGTCAG			

* Modificación de temperatura de hibridación por Jang et al. (2018), para evitar la hibridación de secuencias no deseadas.

** La amplificación fue calculada mediante la ecuación: $E = -1 + 10^{(-1/\text{pendiente})} \times 100$

La amplificación se realizó utilizando un termociclador programado con el protocolo que señala la tabla 7.

Tabla 7. Programación del termociclador para amplificar fragmentos de ARGs de tetraciclinas.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	N° de ciclos
Desnaturalización inicial	95	3 min	1
Amplificación			39
Desnaturalización	95	30 s	
Hibridación	Variable*	10 s	
Polimerización	72	10 s	

* Temperatura variable de acuerdo a los *primers* utilizados

3.19. Procesamiento de datos

3.19.1. Métodos de análisis de datos

La información obtenida en campo se ingresó en hojas de cálculo donde se registró los datos de fecha de muestreo, zona de muestreo, coordenadas, datos morfológicos, cantidad de cepas de bacterianas aisladas, incluyendo sus identificaciones y perfil de resistencia antibiótica. Se registró en formatos impresos pre-establecidos las características morfológicas de los ejemplares muestreados y de las cepas bacterianas aisladas, para luego ser ingresadas a hojas de Excel. Los datos sobre niveles de residuos de tetraciclinas, resistencia antibiótica de las cepas y los tipos de ARGs en las cepas bacterianas también fueron registrados.

Los datos fueron analizados con el software estadístico R 4.1.2 con el que se obtuvieron medidas de estadística descriptiva, también se realizó estadística inferencial para comparar los niveles de residuos antibióticos y la resistencia antibiótica de las cepas bacterianas.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Características externas de *Ucides occidentalis*.

Los 10 cangrejos del manglar *U. occidentalis* recolectados en cada una de las tres zonas evaluadas del manglar de Tumbes (tabla 8), presentaron peso y ancho cefalotorácico (AC) promedios estadísticamente similares ($p>0,05$), todos los ejemplares de *Ucides occidentalis* obtenidos no presentaron lesiones externas.

Tabla 8. Peso y ancho cefalotorácico (Media \pm DE) de *U. occidentalis* colectados en el manglar de Tumbes.

Zona de muestreo	Fecha del muestreo	Peso (g) (Media \pm DE)	Ancho cefalotorácico (mm) (Media \pm DE)
Puerto Pizarro	10/11/2022	183,8 \pm 28,6	81,8 \pm 3,8
El Bendito	27/10/2022 y 06/12/2022	204,9 \pm 42,5	82,7 \pm 5,6
Desembocadura del río Tumbes	06/12/2022	189,2 \pm 20,1	77,8 \pm 3,9

Todos los ejemplares de *Ucides occidentalis* tuvieron un ancho cefalotorácico (AC) mayor a 65 mm, que es la talla mínima de captura según Ordinola et al. (2010); lo que indica que estos cangrejos tuvieron talla comercial.

4.2. Características externas de langostinos silvestres.

En el caso de los langostinos silvestres recolectados en diferentes zonas del manglar de Tumbes, éstos presentaron pesos promedio entre 7,3 y 8,9 g, y longitudes promedio entre 11,2 y 11,7 cm. Valores que fueron estadísticamente similares ($p>0,05$) (tabla 9).

Tabla 9. Peso y longitud (Media \pm DE) de langostinos silvestres (*Litopenaeus vannamei*) recolectados en el manglar de Tumbes.

Zona de muestreo	Fecha del muestreo	Peso (g) (Media \pm DE)	Longitud (mm) (Media \pm DE)
Puerto Pizarro	09/01/2023	8,9 \pm 1,5	11,4 \pm 0,8
El Bendito	23/01/2023	7,3 \pm 2,3	11,2 \pm 1,3
Desembocadura del río Tumbes	29/01/2023	8,4 \pm 2,2	11,7 \pm 1,0

Los langostinos silvestres, colectados para la zona de Puerto Pizarro, tuvieron un peso promedio de 8,9 g y longitud promedio de 11,4 cm; los colectados en El Bendito, un peso y longitud promedio de 7,3 g y 11,20 cm y los de la desembocadura del río Tumbes, un peso promedio de 8,4 g y una longitud promedio de 11,7 cm. Los tamaños y pesos de los langostinos fueron adecuados para hacer la extracción de tejidos (hepatopáncreas, intestino y hemolinfa), puesto que cuando los langostinos tienen pesos y tallas mayores a las de poslarvas, es posible hacerlo; en cambio cuando las poslarvas son muy pequeñas, tan sólo se puede macerar todo el individuo para obtener la muestra según indica Cesasin (2003).

4.3. Parámetros físico químicos del agua en zonas de muestreo

Los resultados obtenidos de los parámetros químicos del agua tomados en las zonas de muestreo (Puerto Pizarro, El Bendito y Desembocadura del río Tumbes) se muestran en la tabla 10, en la que se aprecia que los niveles de nitritos se hallaron en un rango de 0,115 mg/l a 0,145 mg/l; en tanto que, los niveles de nitratos mostraron una mayor variación con valores entre 0,179 mg/l a 0,540 mg/l. Este último valor fue registrado en la zona de El Bendito.

En cuanto a los niveles de fosfatos, fueron similares en Puerto Pizarro y El Bendito (0,69 mg/l y 0,68 mg/l respectivamente), superando al registrado en la Desembocadura del río Tumbes (0,35 mg/l). La alcalinidad siguió una tendencia similar con valores mayores en Puerto Pizarro y El Bendito (245 mg/l y 225 g/l) y menor en la Desembocadura del río Tumbes (190 mg/l).

Con respecto de los parámetros físicos de agua tomados en las zonas de muestreo, fueron bastante similares para salinidad, pH y temperatura; sin embargo, los niveles de oxígeno disuelto mostraron un mayor valor en la Desembocadura del río Tumbes (4,6 mg/l) (tabla 10).

Tabla 10. Parámetros físico químicos del agua tomados en zonas de muestreo.

Zona de muestreo	Parámetros químicos de agua				Parámetros físicos de agua			
	Nitritos (mg/l)	Nitratos (mg/l)	Fosfatos (mg/l)	Alcalinidad (mg/l)	Salinidad (‰)	pH	Temperatura (°C)	Oxígeno disuelto (mg/l)
Puerto Pizarro	0,145	0,179	0,69	245	33,9	7,35	28,8	3,2
El Bendito	0,135	0,540	0,68	225	30,6	7,47	29,3	3,4
Desembocadura del río Tumbes	0,115	0,328	0,35	190	32,5	7,27	27,3	4,6

En cuanto a los parámetros de concentración de nitrato, pH, temperatura y oxígeno disuelto, estos son normados por el Ministerio del Ambiente a través de los estándares de calidad ambiental (ECA) (Ministerio del Ambiente [Minam], 2017), que para el caso del ecosistema de manglar se hallan en la Categoría 4, E3 (estuarios).

En estos estándares se especifica que el nivel de nitratos no debe exceder de 200 mg/l, siendo en este caso, el nivel observado se halla dentro del estándar. Respecto al oxígeno disuelto, debería ser mayor o igual a 4 mg/l, observándose que en dos de los puntos (Puerto Pizarro y El Bendito) no se cumplió tal estándar. Estos valores bajos de oxígeno podrían, de mantenerse así, afectar el crecimiento de los langostinos de la zona, pues según Rojas et al. (2005), valores entre 2 y 5 mg/l, condicionan un menor crecimiento de langostinos en cultivo a largo plazo, lo cual es respaldado por Chávez & Higuera (2003), quienes recomiendan que en los cultivos de langostino no se tengan niveles de oxígenos menores a 4 mg/l; sin embargo, en la zona de desembocadura del río Tumbes, el nivel fue mayor a 4 mg/l, lo cual puede atribuirse a la entrada de agua del río Tumbes, que debido a su turbulencia aporta mayor cantidad de oxígeno.

Con respecto al nivel de pH, éste se halló dentro del estándar especificado por (Minam, 2017), que establece que debe estar entre 6,8 y 8,5; mientras que, la temperatura también cumplió con el respectivo estándar al no observarse una variación de temperatura mayor a 2 °C. Adicionalmente, las temperaturas observadas se hallaron dentro del rango recomendado para el cultivo de langostinos que según Hernández (2016) debe estar entre 25 y 32 °C, de lo cual se infiere que las temperaturas fueron adecuadas para los langostinos que viven en la zona y posiblemente también para los cangrejos del manglar.

Respecto a la salinidad, el ECA del Minam (2017) no ha establecido ningún valor; sin embargo, en el caso del cultivo de langostino, que se realiza en zonas aledañas al manglar, si se han recomendado ciertos valores; así Rojas et al. (2005), refirió que la salinidad óptima debía estar entre 17 a 20 ‰; aunque también reconoce que el langostino *L. vannamei* ha sido cultivado entre 3 y 50 ‰, pero con una menor tasa de crecimiento. De los datos obtenidos se aprecia que la salinidad observada se halla fuera del rango de la salinidad óptima, aunque es una salinidad que permite el crecimiento de los langostinos; de igual manera, se puede inferir lo mismo en el caso de los cangrejos del manglar.

En lo referente a los metabolitos presentes en el agua, los nitritos variaron entre 0,115 mg/l a 0,145 mg/l, los cuales se hallaron algo por encima del límite máximo para este metabolito, indicado por Chávez & Higuera (2003) y Vera & Mendoza (2020) que indican que es de 0,1 mg/l. Sin embargo, los valores registrados se hallaron en el rango que Montero (2019) ha reportado para este metabolito en el manglar de Puerto Pizarro, el cual varió entre 0,45 y 4,24 µM (equivalente a 0,02 y 0,20 mg/l).

Respecto al nivel de nitratos, éstos se hallaron entre 0,179 mg/l y 0,540 mg/l, siendo menores que el límite máximo establecido para un cultivo de langostino que es de 1 mg/l según Vera & Mendoza (2020); aunque según el estudio de Montero (2019) en el manglar de Puerto Pizarro, los niveles de nitritos variaron entre 0,06 µM y 1,32 µM, equivalentes a 0,004 mg/l a 0,08 mg/l; por lo que los valores encontrados fueron superiores a los de este último autor, aunque no es preocupante pues no sobrepasaron los de Vera & Mendoza (2020).

Los niveles de fosfato encontrados en esta investigación variaron entre 0,35 y 0,69 mg/l, siendo este último valor, ligeramente superior al recomendado para el cultivo de langostino, que es de 0,3 a 0,5 mg/l (Vera & Mendoza, 2020); estos valores se hallan dentro del rango que Montero (2019), encontró para los fosfatos en el manglar de Puerto Pizarro, el cual varió entre 1,57 y 9,28 µM (equivalentes a 0,15 y 0,88 mg/l).

Finalmente respecto a la alcalinidad del agua, esta estuvo entre 190 y 245 mg/l; rango que está dentro del recomendado por Vera & Mendoza (2020), para el cultivo de langostinos, el cual debe estar entre 120 y 300 mg de CaCO₃/l.

4.4. Aislamiento en medio TCBS de cepas bacterianas aisladas de cangrejos del manglar y langostinos silvestres.

En la tabla 11 se observa que se aislaron 53 cepas bacterianas presuntivas de *Vibrio* spp. de muestras de tejido (intestino, hepatopáncreas y hemolinfa) de *Ucides occidentalis*; en tanto que, en la tabla 12, se aprecia de manera similar 64 cepas aisladas de langostinos silvestres.

Tabla 11. Cepas bacterianas aisladas de cangrejos del manglar en medio de cultivo TCBS.

Zona	Cepas	
	Cantidad	Código
Puerto Pizarro	14	46 hem, 47 hem, 48 hem, 49 int, 50 int, 51 int, 52 int, 53 int, 54 int, 55 hep, 56 hep, 57 hep, 58 hep, 59 hep
El Bendito	17	1C, 2C, 3C, 4C, 5C, 6C, 7C, 8C, 9C, 10C, 11C, 12C, 13C, 14C, 15C, 16C, 17C
Desembocadura del río Tumbes	22	30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51

Tabla 12. Cepas bacterianas aisladas de langostinos silvestres en medio de cultivo TCBS.

Zona	Cepas	
	Cantidad	Código
Puerto Pizarro	28	Lang-39, Lang-40, Lang-41, Lang-42, Lang-43, Lang-44, Lang-45, Lang-46, Lang-47, Lang-48, Lang-49, Lang-50, Lang-51, Lang-52, Lang-53, Lang-54, Lang-55, Lang-56, Lang-57, Lang-58, Lang-59, 1-PV, Lang-61, Lang-63, Lang-64, Lang-65, Lang-66, Lang-67
El Bendito	29	2L, 3L, 5L, 7L, 9L, 10L, 12L, 13L, 14L, 16L, 17L, 18L, 19L, B-20V, 21L, 23, B-25V, 26L, 27L, 28L, 31L, 33L, 34L, 38L, 40L, 41L, 42L, B-44V, 45L
Desembocadura del río Tumbes	7	BV-40, BV-46, BV-47, BV-49, BV-50, BV-75, BV-78

Las colonias aisladas de *Ucides occidentalis* tuvieron un tamaño entre 0,5 mm a 4 mm, con coloración verde o amarilla; excepto para las colonias aisladas en El Bendito que presentaron solo coloración amarilla y fueron aisladas solo de intestino y hemolinfa.

En el caso de las cepas aisladas de langostinos silvestres presentaron un tamaño entre 1,3 mm a 6 mm con coloración verde o amarilla, la mayoría de las colonias presentaron forma circular y con borde entero, mientras que, una menor proporción tuvieron forma irregular y borde ondulado. Todas las colonias tuvieron elevación convexa, consistencia cremosa y superficie lisa.

Las cepas aisladas de las tres zonas tuvieron colonias que en su mayoría tuvieron forma circular y borde entero, con una menor proporción de colonias con forma puntiforme e irregular y borde ondulado. Todas las colonias presentaron elevación convexa, consistencia cremosa y superficie lisa.

Dado que todas las colonias tuvieron coloración verde o amarilla, fueron circulares, con bordes enteros y elevación convexa, tuvieron características compatibles con *Vibrio* al crecer en TCBS (Sabir et al., 2013), esto es de esperar pues dicho medio es muy efectivo para propiciar el crecimiento de *Vibrio* (Pfeffer & Oliver, 2003).

4.5. Aislamiento en medio TSA de cepas bacterianas aisladas de cangrejos y langostinos silvestres.

Se aislaron 93 cepas de *Ucides occidentalis* en medio de cultivo TSA en hepatopáncreas, intestino y hemolinfa (tabla 13).

Las colonias aisladas de cangrejos del manglar mostraron un tamaño entre 0,5 mm a 3 mm con coloración crema, la mayoría tuvieron forma circular y en menor cantidad forma puntiforme, todas las colonias tuvieron borde entero, elevación convexa, consistencia cremosa y superficie lisa.

Se aislaron 68 cepas de langostinos silvestres en medio de cultivo TSA en hepatopáncreas, intestino y hemolinfa (tabla 14).

Las colonias aisladas de langostinos silvestres presentaron un tamaño entre 1,2 mm a 3,5 mm con coloración crema con forma circular y borde entero y en menor cantidad con forma puntiforme e irregular y borde ondulado, todas las colonias tuvieron elevación convexa, consistencia cremosa y superficie lisa.

Tabla 13. Cepas aisladas de cangrejos de manglar en medio de cultivo TSA.

Zona	Cepas	
	Cantidad	Código
Puerto Pizarro	45	1 hem, 2 hem, 3 hem, 4 hem, 5 hem, 6 hem, 7 hem, 8 hep, 9 hep, 10 hep, 11 hep, 12 hep, 13 hep, 14 hep, 15 hep, 16 hep, 17 hep, 18 hep, 19 hep, 20 hep, 21 hep, 22 hep, 23 hep, 24 hep, 25 hep, 26 hep, 27 hep, 28 int, 29 int, 30 int, 31 int, 32 int, 33 int, 34 int, 35 int, 36 int, 37 int, 38 int, 39 int, 40 int, 41 int, 42 int, 43 int, 44 int, 45 int
El Bendito	19	1B-hem, 2B-hem, 3B-hem, 4B-hem, 5B-hem, 6B-hem, 7B-hem, 8B-hem, 9B-hem, 10B-hem, 11B-hep, 12B-hep, 13B-hep, 14B-hep, 15B-int, 16B-int, 17B-int, 18B-int, 19B-int
Desembocadura del río Tumbes	29	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29

Tabla 14. Cepas aisladas de langostinos silvestres en medio de cultivo TSA.

Zona	Cepas	
	Cantidad	Código
Puerto Pizarro	38	Lang-1, Lang-2, Lang-3, Lang-4, Lang-5, Lang-6, Lang-7, Lang-8, Lang-9, Lang-10, Lang-11, Lang-12, Lang-13, Lang-14, Lang-15, Lang-16, Lang-17, Lang-18, Lang-19, Lang-20, Lang-21, Lang-22, Lang-23, Lang-24, Lang-25, Lang-26, Lang-27, Lang-28, Lang-29, Lang-30, Lang-31, Lang-32, Lang-33, Lang-34, Lang-35, Lang-36, Lang-37, Lang-38
El Bendito	20	46, B-48V, 50, 54, 56, 60, 61, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, B-72V, 73, 75, 76, 79, 80
Desembocadura del río Tumbes	10	B-44, B-45, B-51, B-66, B-64, B-65, B-68, B-73, B-74, B-75

Como se observa se pudo aislar un número más alto de cepas en medio TSA (151) que en TCBS (117), esto es justificable, puesto que TSA es un medio genérico que favorece el crecimiento de un gran número de especies bacterianas, además no contiene sustancias inhibidoras del crecimiento bacteriano de ciertos grupos, lo que si ocurre en el medio TCBS que es un medio diseñado para favorecer el crecimiento de *Vibrio*, por lo que contiene citrato de sodio, bilis de buey además de tener un pH alcalino que inhibe el crecimiento de muchas otras especies bacterianas que acompañan a *Vibrio* (Britania, 2021a, 2021b).

4.6. Caracterización molecular de cepas aisladas de *Ucides occidentalis*.

De las 146 cepas aisladas y purificadas se seleccionaron al azar 35 cepas a las mismas que realizó la caracterización molecular, encontrándose que la mayoría de las cepas (17) correspondieron al género *Vibrio*, siendo la especie más frecuente *V. alginolyticus*, seguido de *V. parahaemolyticus* y en menor grado *V. fortis*, *V. rotiferianus* y *V. natrigens*; por otro lado se encontró en menor proporción el género *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Enterobacter* y dos cepas que correspondieron al género *Halomonas* y *Exiguobacterium* (tabla 15).

Tabla 15. Identificación molecular de cepas bacterias aisladas de *U. occidentalis*.

Zona de muestreo	Cepa	Especie	%Identidad	
			GenBank	SILVA
Puerto Pizarro	3 hem	<i>Bacillus valezensis</i>	98,55	98,42
	14 hep	<i>Vibrio natrigens</i>	100,00	100,00
	20 hep	<i>Bacillus cereus</i>	100,00	100,00
	23 hep	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	100,00	100,00
	40 int	<i>Enterobacter cloacae</i>	100,00	100,00
	45 int	<i>Vibrio alginolyticus</i>	100,00	99,93
	46 hem	<i>Bacillus</i> spp.	99,70	99,70
	48 hem	<i>Bacillus cereus</i>	100,00	100,00
	49 int	<i>Enterobacter cloacae</i>	99,32	99,40
	50 int	<i>Staphylococcus haemolitycus</i>	100,00	100,00
	52 int	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	100,00	100,00
	53 int	<i>Vibrio alginolyticus</i>	100,00	100,00
	54 int	<i>Bacillus cereus</i>	100,00	100,00
	55 hep	<i>Bacillus</i> spp.	100,00	100,00
	56 hep	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	100,00	99,93
El Bendito	4C	<i>Vibrio fortis</i>	99,90	99,89
	5B-hem	<i>Vibrio alginolyticus</i>	99,37	99,15
	8C	<i>Vibrio fortis</i>	99,93	100,00
	9B-hem	<i>Vibrio rotiferianus</i>	98,97	98,96
	12B-hep	<i>Staphylococcus hominis</i>	99,34	99,17
	14B-hep	<i>Vibrio alginolyticus</i>	100,00	99,72
	15B-int	<i>Vibrio alginolyticus</i>	99,72	100,00
	16B-int	<i>Vibrio alginolyticus</i>	99,81	99,61
	16C	<i>Halomonas</i> spp.	99,93	99,92
Desembocadura del río Tumbes	20	<i>Bacillus siamensis</i>	100,00	100,00
	21	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	100,00	100,00
	24	<i>Vibrio alginolyticus</i>	99,82	99,76
	28	<i>Exiguobacterium profundum</i>	100,00	100,00
	30	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	99,50	99,80
	32	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	100,00	100,00
	34	<i>Vibrio alginolyticus</i>	100,00	100,00
	37	<i>Bacillus altitudinis</i>	100,00	100,00
	41	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	100,00	100,00
	48	<i>Vibrio alginolyticus</i>	100,00	100,00
	49	<i>Priestia (Bacillus) endophytica</i>	99,93	99,58

En esta investigación se ha encontrado que la mayor parte de cepas identificadas correspondieron a *Vibrio* spp.; la amplia abundancia de este género en *Ucides occidentalis*, si bien no ha sido reportada anteriormente, porque no se encuentran publicaciones al respecto en dicha especie. Sin embargo, si existen reportes realizados en *Ucides cordatus*, en los cuales se han hallado que las cepas de *Vibrio* fueron abundantes (Carvalho et al., 2016; Vieyra et al. 2004).

Por otra parte, en esta investigación se ha hallado una cantidad importantes de cepas de *Bacillus* spp. y en menor grado de *Staphylococcus*, *Enterobacter*, *Halomonas* y *Exiguobacterium*; aunque, este tipo de hallazgo no se ha reportado en los trabajos antes señalados, esto se debe a que dichos estudios estuvieron dirigidos a géneros relacionados a la inocuidad alimenticia de este recurso: *Escherichia*, *Vibrio* y *Salmonella*; por lo que, al no estar dirigidos a cepas cultivables en general, es lógico que no hayan podido detectar la presencia de otros géneros que si se han hallado en esta investigación.

En la tabla 16 se exponen las características morfológicas de las cepas bacterianas aisladas de cangrejos del manglar. Las colonias que crecieron en TSA fueron de color crema, con diámetros de 0,5 a 3 mm y formas puntiformes o circulares; en tanto que, las que crecieron en TCBS fueron de colores amarillo o verde, tuvieron diámetros de 0,5 a 4 mm y con formas circulares y en menor medida puntiforme. Este tipo de colonias son comúnmente observadas en los medios empleados, así por ejemplo Álvarez et al. (2000) han reportado cepas bacterianas aisladas de camarones marinos en Venezuela, que mostraron colonias de diámetros variados y color crema en medio TSA, características que son similares a las observadas en esta investigación.

Tabla 16. Características morfológicas de las colonias seleccionadas de *Ucides occidentalis*.

Zona de muestreo	Cepas	Tejido	Medio de cultivo	Color	Tamaño	Forma
Puerto Pizarro	3 hem	Hemolinfa	TSA	Crema	0,5	Puntiforme
	14 hep	Hepatopáncreas	TSA	Crema	3,0	Circular
	20 hep	Hepatopáncreas	TSA	Crema	0,5	Puntiforme
	23 hep	Hepatopáncreas	TSA	Crema	1,0	Circular
	40 int	Intestino	TSA	Crema	2,0	Circular
	45 int	Intestino	TSA	Crema	2,0	Circular
	46 hem	Hemolinfa	TCBS	Verde	4,0	Circular
	48 hem	Hemolinfa	TCBS	Verde	2,0	Circular
	49 int	Intestino	TCBS	Verde	1,5	Circular
	50 int	Intestino	TCBS	Verde	1,5	Circular
	52 int	Intestino	TCBS	Verde	1,0	Circular
	53 int	Intestino	TCBS	Verde	2,0	Circular
	54 int	Intestino	TCBS	Verde	3,0	Circular
	55 hep	Hepatopáncreas	TCBS	Verde	1,0	Circular
	56 hep	Hepatopáncreas	TCBS	Amarilla	2,5	Circular
El Bendito	4C	Intestino	TCBS	Amarilla	0,5	Puntiforme
	5B-hem	Hemolinfa	TSA	Crema	1,0	Circular
	8C	Hemolinfa	TCBS	Amarilla	2,0	Circular
	9B-hem	Hemolinfa	TSA	Crema	0,5	Puntiforme
	12B-hep	Hepatopáncreas	TSA	Crema	1,5	Circular
	14B-hep	Hepatopáncreas	TSA	Crema	2,0	Circular
	15B-int	Intestino	TSA	Crema	3,0	Circular
	16B-int	Intestino	TSA	Crema	3,0	Circular
	16C	Hemolinfa	TCBS	Amarilla	1,0	Circular
Desembocadura del río Tumbes	20	Hepatopáncreas	TSA	Crema	2,5	Circular
	21	Hepatopáncreas	TSA	Crema	2,5	Circular
	24	Hemolinfa	TSA	Crema	2,5	Circular
	28	Hemolinfa	TSA	Crema	1,5	Circular
	30	Intestino	TCBS	Verde	0,5	Puntiforme
	32	Intestino	TCBS	Amarilla	3,5	Circular
	34	Intestino	TCBS	Amarilla	3,5	Circular
	37	Intestino	TCBS	Amarilla	1,0	Circular
	41	Hepatopáncreas	TCBS	Verde	1,5	Circular
	48	Hemolinfa	TCBS	Amarilla	1,5	Circular
49	Hemolinfa	TCBS	Verde	2,0	Circular	

En la tabla 17 se muestra la caracterización Gram, pruebas de oxidasa y catalasa de cepas bacterianas aisladas de cangrejos del manglar; el cual en su mayoría presentaron forma de coco bacilo gram negativos y oxidasa positiva; puesto que se trataron presuntivamente del género *Vibrio* tal como precisa Alsina & Blanch (1994), que es de esperarse de obtener dicho genero; sin embargo, existen investigaciones como la de Rivera & Gándara (2001), donde mencionan que a pesar que el género

Vibrio en su mayoría son catalasa positiva; en algunos casos pueden encontrarse como catalasa negativa (Kesarcodi-Watson et al., 2009).

Respecto a las cepas que tuvieron forma de coco, fueron gram positivas; el cual se trató presuntivamente del género *Staphylococcus* como lo ha mencionado Wieser & Busse (2000), que son características del mencionado género.

Tabla 17. Tinción de Gram, prueba de catalasa y oxidasa de cepas seleccionadas de *Ucides occidentalis*.

Zona de muestreo	Cepa	Forma	Tinción de Gram	Prueba de catalasa	Prueba de oxidasa
Puerto Pizarro	3 hem	Cocos bacilos	-	-	-
	14 hep	Cocos	-	+	-
	20 hep	Cocos bacilos	+	+	-
	23 hep	Cocos	+	-	+
	40 int	Cocos bacilos	-	-	-
	45 int	Cocos bacilos	-	-	+
	46 hem	Cocos bacilos	-	-	+
	48 hem	Cocos	-	-	+
	49 int	Cocos bacilos	-	+	+
	50 int	Cocos bacilos	-	+	-
	52 int	Cocos bacilos	+	-	-
	53 int	Cocos	+	-	+
	54 int	Cocos	-	-	-
	55 hep	Cocos bacilos	-	+	-
	56 hep	Cocos bacilos	-	+	+
El Bendito	4C	Cocos bacilos	-	-	+
	5B-hem	Cocos	-	-	+
	8C	Cocos bacilos	-	-	+
	9B-hem	Cocos bacilos	-	-	+
	12B-hep	Cocos	+	-	+
	14B-hep	Cocos	+	-	+
	15B-int	Cocos	-	-	+
	16B-int	Cocos bacilos	+	-	+
	16C	Bacilos	-	+	-
Desembocadura del río Tumbes	20	Coco bacilo	-	-	-
	21	Coco bacilo	-	-	+
	24	Coco bacilo	-	-	+
	28	Coco	-	-	+
	30	Coco bacilo	-	+	+
	32	Coco bacilo	-	-	-
	34	Cocos	-	+	+
	37	Coco bacilo	-	+	-
	41	Coco	-	+	+
	48	Coco bacilo	-	-	+
	49	Bacilo	-	+	+

4.7. Caracterización de cepas bacterianas seleccionadas de langostinos silvestres.

De las 132 cepas bacterianas aisladas y purificadas se seleccionaron al azar 23 cepas a las mismas que se le realizó la extracción de ADN; el cual se logró la identificación molecular de 20 cepas bacterianas (tabla 18).

Tabla 18. Identificación molecular de cepas bacterianas aisladas de langostinos silvestres.

Zona de muestreo	Cepa	Especie	%Identidad	
			GenBank	SILVA
Puerto Pizarro	1-PV	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	99,80	100,00
	Lang 27	ND*	--	--
	Lang 35	ND*	--	--
	Lang 39	<i>Vibrio alginolyticus</i>	100,00	99,93
	Lang 46	ND*	--	--
	Lang 53	<i>Staphylococcus capitis</i>	100,00	96,40
	Lang 55	<i>Vibrio alginolyticus</i>	99,93	100,00
El Bendito	B-20V	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	100,00	100,00
	B-25V	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	100,00	100,00
	B-44V	<i>Vibrio alginolyticus</i>	100,00	99,93
	45L	<i>Enterobacter cloacae</i>	99,81	99,81
	B-48V	<i>Vibrio alginolyticus</i>	100,00	100,00
	50	<i>Enterobacter cloacae</i>	99,32	99,65
	56	<i>Enterobacter cloacae</i>	98,66	98,65
	67	<i>Enterobacter cloacae</i>	99,32	99,32
	B-72V	<i>Vibrio proteolyticus</i>	99,80	81,69
Desembocadura del río Tumbes	BV-40	<i>Vibrio furnissi</i>	100,00	99,93
	BV-46	<i>Shewanella algae</i>	100,00	99,93
	BV-47	<i>Vibrio alginolyticus</i>	99,86	99,93
	BV-49	<i>Vibrio harveyi</i>	99,86	99,86
	BV-50	<i>Vibrio alginolyticus</i>	100,00	100,00
	BV-75	<i>Vibrio diabolicus</i>	99,86	99,73
	BV-78	<i>Vibrio alginolyticus</i>	100,00	100,00

*ND: no se pudo lograr la identificación de la cepa pues la calidad del ADN extraído no fue suficiente para lograr un adecuado secuenciamiento.

Las cepas bacterianas evaluadas molecularmente mediante un fragmento de su gen 16S ARNr e identificadas correspondieron principalmente al género *Vibrio* y en menor grado a *Enterobacter* y dos cepas correspondieron a género *Staphylococcus* y *Shewanella*; puesto que Chau et al. (2021), menciona que es posible identificar

cepas bacterias mediante la secuenciación de su gen 16S ARNr, logrando llegar a género y especie.

La identificación fue bastante confiable dado que el porcentaje de identidad en las dos bases de datos de identificación genómica (GenBank y SILVA) fueron bastante altas; al igual que Chen et al. (2024); utilizó la base de datos del software BLAST del NCBI para lograr la identificación de las cepas bacterianas.

La cepa B-72V tuvo un porcentaje de identidad de 81,68% en la base de datos de SILVA, pero de 100% en la base de datos de GenBank. Debido a que el porcentaje de identidad en esta segunda base de datos, superó al 99%, fue posible identificar a dicha cepa a nivel de especie.

En la tabla 19 se muestran las características morfológicas de las cepas bacterianas aisladas de langostinos silvestres. Las colonias que crecieron en TCBS fueron de colores amarillo o verdes, tuvieron diámetros de 1,3 mm a 6 mm, la mayoría de las colonias presentaron forma irregular y borde entero. Todas las colonias tuvieron elevación convexa, consistencia cremosa y superficie lisa, mientras que las colonias que crecieron en medio de cultivo TSA presentaron coloración crema, tuvieron diámetros entre 1,2 mm a 3,5 mm con forma circular y borde entero y menor cantidad con forma puntiforme e irregular, todas las colonias presentaron elevación convexa, consistencia cremosa y superficie lisa. Este tipo de colonias son frecuentemente observadas en los medios de cultivo empleados, así por ejemplo Aguirre et al. (2021); Tinoco et al. (2023) y Potosí (2024), los cuales han reportado colonias que crecieron en TCBS con formas circulares o puntiformes, diámetros variados y colores amarillos o verdes son características compatibles con las de *Vibrio* spp.

Tabla 19. Caracterización de la morfología de colonias seleccionadas de langostinos silvestres.

Zona de muestreo	Cepas	Tejido	Medio de cultivo	Características de las colonias		
				Color	Diámetro (mm)	Forma
Puerto Pizarro	1-PV	Hepatopáncreas	TCBS	Verde	1,4	Circular
	Lang 27	Intestino	TSA	Crema	1,9	Circular
	Lang 35	Intestino	TSA	Crema	1,3	Circular
	Lang 39	Intestino	TCBS	Amarilla	3,2	Circular
	Lang 46	Intestino	TCBS	Amarilla	1,6	Circular
	Lang 53	Hepatopáncreas	TCBS	Amarilla	1,3	Circular
	Lang 55	Hepatopáncreas	TCBS	Amarilla	4,2	Circular
El Bendito	B-20V	Intestino	TCBS	Amarilla	2,0	Circular
	B-25V	Intestino	TCBS	Amarilla	1,8	Circular
	B-44V	Hemolinfa	TCBS	Amarilla	3,3	Circular
	45L	Hemolinfa	TCBS	Verde	2,4	Circular
	B-48V	Hepatopáncreas	TSA	Crema	1,6	Circular
	50	Hepatopáncreas	TSA	Crema	3,5	Circular
	56	Intestino	TSA	Crema	1,6	Circular
	67	Intestino	TSA	Crema	1,9	Circular
B-72V	Hemolinfa	TSA	Crema	1,2	Circular	
Desembocadura del río Tumbes	BV-40	Hepatopáncreas	TCBS	Verde	2,5	Circular
	BV-46	Hepatopáncreas	TCBS	Verde	1,5	Circular
	BV-47	Hepatopáncreas	TCBS	Verde	3,0	Circular
	BV-49	Hepatopáncreas	TCBS	Verde	6,0	Circular
	BV-50	Hepatopáncreas	TCBS	Verde	3,5	Circular
	BV-75	Hepatopáncreas	TCBS	Verde	5,0	Circular
	BV-78	Hepatopáncreas	TCBS	Verde	2,0	Circular

En la tabla 20 se observa la caracterización de cepas bacterianas aisladas de tejidos sólidos y hemolinfa a través de pruebas Gram, catalasa y oxidasa; pues que las características que mostraron en su mayoría se trataron del género *Vibrio*, siendo bacilos gran negativos, oxidasa y catalasa positiva; que probablemente es de esperarse en bacterias del género como lo han mencionado Alsina & Blanch, (1994); sin embargo, también pueden existir algunos casos de cepas bacterianas donde son catalasa negativa que presuntivamente se tratarían del género *Vibrio* tal como lo indica Kesarcodi-Watson et al. (2009).

Tabla 20. Tinción de Gram, pruebas de catalasa y oxidasa de cepas seleccionadas de langostino silvestres.

Zona de muestreo	Cepa	Forma	Tinción de Gram	Prueba de catalasa	Prueba de oxidasa
Puerto Pizarro	1-PV	Coco bacilo	-	-	+
	Lang 27	Coco bacilo	-	+	+
	Lang 35	Coco bacilo	-	+	+
	Lang 39	Coco bacilo	-	+	+
	Lang 46	Coco bacilo	-	-	+
	Lang 53	Coco	+	+	-
	Lang 55	Coco	-	+	+
	El Bendito	B-20V	Coco bacilo	-	+
B-25V		Coco bacilo	-	+	+
B-44V		Coco bacilo	-	+	+
45L		Coco	+	+	-
B-48V		Coco bacilo	-	+	+
50		Coco	+	+	-
56		Coco	+	+	-
67		Coco	+	+	-
B-72V		Coco bacilo	-	+	+
Desembocadura del río Tumbes	BV-40	Coco bacilo	-	+	+
	BV-46	Coco bacilo	-	+	-
	BV-47	Coco bacilo	-	+	+
	BV-49	Coco bacilo	-	+	+
	BV-50	Coco bacilo	-	+	+
	BV-75	Coco bacilo	-	+	+
	BV-78	Coco bacilo	-	+	+

En la tabla 21 se aprecia el diámetro de los halos de inhibición producidos por 12 antibióticos en cepas bacterianas aisladas de *U. occidentalis*. Los diámetros fueron bastantes variables, encontrándose entre 0,0 y 41,7 mm según la cepa evaluada y el antibiótico ensayado. En la tabla 21 se observa de igual manera los halos producidos por 12 antibióticos en cepas bacterianas aisladas de langostinos silvestres (*L. vannamei*); los diámetros de los halos de inhibición se hallaron entre 0,0 y 35,7 mm. La variabilidad observada de los diámetros encontrados en cuanto a cepas bacterianas aisladas de ambos organismos es común en investigaciones de sensibilidad antibiótica en crustáceos, así por ejemplo, Aguirre (2019) aisló cepas de *Vibrio* spp. en langostinos en Tumbes, que produjeron halos de inhibición variaron entre 5 y 39 mm; por otro lado, Tinoco (2020), encontró halos de inhibición entre 0 y 40 mm en cepas de *Vibrio* spp. aislados de langostinos de Tumbes.

4.8. Diámetro de inhibición de cepas bacterianas aisladas de *Ucides occidentalis* y langostinos silvestres.

Tabla 21. Diámetro de inhibición de cepas seleccionadas de *Ucides occidentalis*.

Zona	Cepa	Penicilinas	Fosfonatos	Fenicoles		Tetraciclinas		Aminoglucósidos		Quinolonas			Macrólidos
		Ampicilinas (10µg)	Fosfomicina (50 µg)	Cloranfenicol (30µg)	Florfenicol (30 µg)	Oxitetraciclina (30µg)	Tetraciclina (30µg)	Estreptomina (10 µg)	Gentamicina (10µg)	Ácido nalidixico (30µg)	Norfloxacina (10 µg)	Enrofloxacina (5 µg)	Azitromicina (15 µg)
Puerto Pizarro	3 hem	12,7 ± 2,3	8,0 ± 1,0	28,7 ± 8,1	30,3 ± 0,6	34,3 ± 3,1	29,3 ± 17,0	9,7 ± 0,6	23,3 ± 3,1	18,3 ± 6,7	28,0 ± 1,0	24,7 ± 11,8	19,0 ± 1,0
	14 hep	18,3 ± 2,9	24,7 ± 0,6	25,3 ± 0,6	24,0 ± 2,0	15,0 ± 5,0	18,7 ± 2,3	10,3 ± 2,3	19,0 ± 1,0	0,0 ± 0,0	11,0 ± 1,0	18,3 ± 1,5	0,0 ± 0,0
	20 hep	22,7 ± 19,7	12,3 ± 0,6	18,3 ± 23,1	21,7 ± 1,5	33,0 ± 2,0	29,0 ± 7,8	15,3 ± 0,6	22,7 ± 0,6	27,0 ± 11,3	33,7 ± 2,1	31,3 ± 4,2	29,7 ± 0,6
	23 hep	15,0 ± 13,2	0,0 ± 0,0	33,0 ± 7,9	30,3 ± 0,6	37,0 ± 1,0	35,3 ± 5,7	7,7 ± 0,6	22,0 ± 3,6	16,0 ± 21,9	31,7 ± 1,5	30,0 ± 5,0	8,3 ± 1,5
	40 int	22,0 ± 3,5	0,0 ± 0,0	25,0 ± 0,0	23,3 ± 1,5	31,0 ± 2,6	30,0 ± 0,0	11,0 ± 1,0	22,0 ± 1,7	16,0 ± 2,6	26,3 ± 2,5	27,3 ± 1,5	0,0 ± 0,0
	45 int	13,7 ± 4,2	23,7 ± 6,4	33,0 ± 12,2	25,0 ± 3,0	32,0 ± 0,0	33,7 ± 1,5	6,3 ± 5,5	10,3 ± 9,2	12,7 ± 5,5	25,3 ± 2,5	29,3 ± 4,9	16,0 ± 19,1
	46 hem	22,3 ± 2,5	0,0 ± 0,0	27,3 ± 2,5	21,0 ± 0,0	32,3 ± 1,5	31,0 ± 1,0	11,7 ± 1,2	21,0 ± 1,7	17,7 ± 0,6	25,0 ± 1,0	26,3 ± 1,5	0,0 ± 0,0
	48 hem	20,0 ± 5,0	32,7 ± 2,5	24,7 ± 0,6	25,0 ± 3,6	27,0 ± 2,0	27,0 ± 3,5	16,7 ± 2,9	18,0 ± 3,5	20,0 ± 0,0	22,7 ± 4,7	25,0 ± 4,4	16,7 ± 0,6
	49 int	35,0 ± 3,0	0,0 ± 0,0	26,7 ± 2,9	37,7 ± 3,1	28,7 ± 0,6	31,3 ± 2,3	14,7 ± 0,6	20,7 ± 1,2	19,3 ± 1,2	24,3 ± 4,0	27,7 ± 2,3	20,7 ± 1,2
	50 int	24,3 ± 12,9	11,0 ± 1,0	22,0 ± 2,6	28,0 ± 0,0	31,0 ± 1,0	28,7 ± 7,6	15,0 ± 1,7	24,0 ± 1,7	21,0 ± 1,7	21,0 ± 2,0	30,0 ± 9,0	29,7 ± 1,5
	52 int	16,0 ± 14,2	2,7 ± 4,6	33,3 ± 5,1	26,0 ± 3,6	36,3 ± 5,1	36,3 ± 2,5	8,3 ± 1,2	23,0 ± 4,4	13,0 ± 4,6	30,0 ± 2,0	30,3 ± 4,5	5,3 ± 4,7
	53 int	3,3 ± 5,8	18,3 ± 3,2	24,3 ± 7,1	22,7 ± 4,0	18,7 ± 2,9	19,3 ± 2,9	8,7 ± 1,5	12,3 ± 2,3	20,7 ± 5,1	27,3 ± 1,5	15,3 ± 3,1	15,3 ± 1,5
	54 int	14,0 ± 1,0	23,7 ± 2,3	25,0 ± 0,0	32,7 ± 2,5	23,3 ± 1,5	23,0 ± 0,0	14,0 ± 3,5	18,0 ± 1,0	21,7 ± 0,6	26,3 ± 3,1	24,7 ± 0,6	11,3 ± 3,2
	55 hep	25,0 ± 0,0	25,0 ± 0,0	26,0 ± 3,5	24,0 ± 0,0	26,7 ± 2,9	28,0 ± 6,9	11,3 ± 1,5	0,0 ± 0,0	10,7 ± 1,2	29,7 ± 3,1	28,0 ± 1,7	0,0 ± 0,0
	56 hep	10,0 ± 1,7	19,3 ± 0,6	28,7 ± 4,2	31,3 ± 4,0	12,7 ± 3,8	17,7 ± 3,8	10,7 ± 4,6	17,0 ± 1,7	11,0 ± 13,5	26,7 ± 4,2	16,3 ± 1,5	5,3 ± 9,2
	El Bendito	4C	19,0 ± 1,0	27,0 ± 1,7	28,0 ± 2,6	24,3 ± 1,5	28,3 ± 2,9	28,0 ± 2,6	14,0 ± 1,7	26,3 ± 2,9	16,0 ± 1,0	22,7 ± 2,5	29,7 ± 4,5
5B-hem		22,7 ± 5,5	28,3 ± 0,6	25,7 ± 2,9	24,3 ± 4,0	30,0 ± 0,0	26,7 ± 2,9	10,3 ± 0,6	16,0 ± 4,6	19,3 ± 1,2	16,0 ± 1,7	26,3 ± 3,2	20,0 ± 0,0
8C		19,7 ± 0,6	17,3 ± 1,2	19,7 ± 0,6	20,3 ± 1,5	32,0 ± 0,0	31,0 ± 1,7	16,7 ± 0,6	26,0 ± 1,0	17,7 ± 0,6	34,0 ± 4,6	34,0 ± 1,7	16,7 ± 0,6
9B-hem		18,3 ± 2,1	20,7 ± 1,2	35,7 ± 0,6	20,3 ± 0,6	36,3 ± 0,6	39,3 ± 4,9	14,0 ± 0,0	27,7 ± 4,0	22,3 ± 2,1	27,0 ± 2,6	30,0 ± 1,0	25,7 ± 1,5
12B- hep		26,3 ± 3,2	23,3 ± 0,6	33,0 ± 3,6	22,3 ± 1,2	29,7 ± 0,6	32,7 ± 2,5	15,0 ± 1,7	20,7 ± 5,0	12,7 ± 3,1	24,7 ± 2,5	20,7 ± 2,1	17,0 ± 1,0
14B-hep		19,0 ± 1,0	28,3 ± 1,5	25,7 ± 1,2	24,0 ± 1,0	33,0 ± 1,0	29,0 ± 1,0	14,0 ± 1,0	22,7 ± 2,5	16,0 ± 1,0	22,3 ± 2,5	31,7 ± 1,5	0,0 ± 0,0
15B-int		16,0 ± 4,0	8,0 ± 0,0	20,7 ± 17,9	19,3 ± 2,1	34,0 ± 3,6	26,0 ± 22,9	10,0 ± 0,0	23,0 ± 3,5	19,0 ± 1,0	22,0 ± 3,0	35,0 ± 3,0	19,7 ± 0,6
16B-int		16,0 ± 1,0	19,0 ± 1,0	38,0 ± 1,0	30,0 ± 9,5	32,0 ± 1,0	39,3 ± 0,6	17,0 ± 1,0	21,3 ± 1,2	21,0 ± 1,0	29,3 ± 2,1	39,3 ± 2,1	21,7 ± 1,5
16C		21,0 ± 1,7	25,0 ± 1,0	26,7 ± 1,2	32,7 ± 2,5	23,3 ± 5,8	18,3 ± 4,0	11,3 ± 1,5	22,0 ± 2,6	0,0 ± 0,0	16,3 ± 1,5	27,3 ± 0,6	23,3 ± 2,9
Desembocadura del río Tumbes	20	15,7 ± 1,5	22,3 ± 2,5	23,0 ± 1,0	35,7 ± 7,6	22,7 ± 2,1	28,0 ± 2,0	14,7 ± 0,6	17,7 ± 0,6	20,7 ± 1,2	21,0 ± 1,0	21,0 ± 1,0	14,0 ± 1,0
	21	14,3 ± 4,2	17,3 ± 1,5	26,0 ± 5,3	0,0 ± 0,0	20,7 ± 3,1	22,7 ± 6,1	11,0 ± 1,0	20,0 ± 4,0	18,3 ± 3,8	23,7 ± 4,7	20,3 ± 5,5	16,0 ± 3,0
	24	21,3 ± 1,5	19,7 ± 0,6	18,0 ± 1,5	25,7 ± 4,2	18,0 ± 1,0	16,0 ± 1,0	12,0 ± 1,0	19,7 ± 0,6	12,0 ± 1,0	27,3 ± 0,6	18,3 ± 1,5	13,0 ± 1,0
	28	6,3 ± 11,0	8,0 ± 7,5	31,0 ± 12,3	32,0 ± 2,6	22,3 ± 4,6	31,3 ± 6,0	8,3 ± 1,5	22,3 ± 4,5	21,3 ± 17,1	22,0 ± 3,0	29,3 ± 3,8	7,0 ± 7,5
	30	2,7 ± 4,6	29,7 ± 6,7	40,7 ± 2,3	23,7 ± 3,1	31,3 ± 2,3	28,7 ± 4,0	2,7 ± 4,6	28,7 ± 4,2	41,7 ± 2,9	24,7 ± 2,5	27,0 ± 1,7	24,7 ± 1,2
	32	18,3 ± 1,5	21,3 ± 4,2	17,7 ± 0,6	33,7 ± 4,0	28,0 ± 2,0	15,0 ± 1,0	30,0 ± 2,0	19,0 ± 1,0	17,3 ± 0,6	33,0 ± 0,0	23,3 ± 6,4	16,7 ± 0,6
	34	0,0 ± 0,0	16,0 ± 3,6	22,7 ± 3,1	20,0 ± 0,0	17,7 ± 3,1	18,7 ± 3,1	8,3 ± 0,6	14,3 ± 0,6	21,3 ± 5,5	22,0 ± 3,6	13,0 ± 2,6	14,7 ± 1,5
	37	22,0 ± 14,7	24,0 ± 14,8	26,7 ± 12,6	23,3 ± 3,2	28,7 ± 1,5	29,0 ± 1,0	14,0 ± 4,4	21,0 ± 2,6	27,0 ± 8,2	21,7 ± 3,1	27,0 ± 4,4	23,0 ± 2,0
	41	18,7 ± 5,5	25,7 ± 1,2	18,0 ± 1,0	26,0 ± 0,0	20,3 ± 0,6	22,7 ± 2,1	14,3 ± 0,6	26,3 ± 1,5	20,3 ± 0,6	23,7 ± 1,2	20,3 ± 0,6	14,3 ± 0,6
	48	18,3 ± 16,1	0,0 ± 0,0	26,0 ± 13,0	27,2 ± 1,2	29,7 ± 2,1	32,7 ± 6,4	18,0 ± 2,0	24,0 ± 5,6	27,3 ± 7,8	27,0 ± 1,0	29,7 ± 0,6	17,3 ± 1,5
	49	19,3 ± 0,6	26,0 ± 1,0	26,3 ± 1,5	22,7 ± 3,8	29,0 ± 1,0	16,7 ± 0,6	14,7 ± 0,6	18,3 ± 1,5	13,0 ± 1,0	27,0 ± 0,0	28,0 ± 1,0	16,3 ± 1,5

Tabla 22. Diámetro de inhibición de cepas seleccionadas de langostinos silvestres.

Zona	Cepa	Penicilinas	Fosfonatos	Fenicoles		Tetraciclinas		Aminoglucósidos		Quinolonas			Macrólidos
		Ampicilinas (10 µg)	Fosfomicina (50 µg)	Cloranfenicol (30µg)	Florfenicol (30 µg)	Oxitetraciclina (30 µg)	Tetraciclina (30 µg)	Estreptomina (10 µg)	Gentamicina (10 µg)	Ácido nalidixico (30 µg)	Norfloxacina (10 µg)	Enrofloxacina (5 µg)	Azitromicina (15 µg)
Puerto Pizarro	1-PV	9,7±8,5	22,3±2,3	30,0±6,2	25,7±2,5	28,7±3,2	28,7±6,4	11,0±5,3	20,7±0,6	23,0±2,6	19,0±1,0	24,7±4,5	18,3±5,5
	Lang 27	10,0±1,0	13,3±1,2	24,0±4,6	22,7±2,5	18,0±2,6	19,7±3,1	8,3±8,5	17,0±1,7	22,0±5,3	21,0±1,0	17,3±8,4	18,3±1,5
	Lang 35	14,7±4,9	26,7±11,5	24,0±1,7	23,0±4,6	17,3±3,8	21,7±7,6	14,0±3,5	22,7±2,3	21,3±7,6	22,7±2,1	28,0±2,0	20,0±2,6
	Lang 39	13,0±1,0	15,0±1,0	29,3±4,0	27,7±2,5	15,0±1,0	33,0±0,0	11,0±1,0	16,0±1,0	14,0±2,0	19,7±0,6	35,0±2,6	15,7±2,1
	Lang 46	19,0±17,7	6,0±0,0	29,3±5,9	34,0±5,6	35,0±0,0	31,7±8,4	12,3±0,6	25,0±0,0	15,7±3,1	22,7±2,1	25,0±1,7	23,7±1,2
	Lang 53	14,3±12,9	20,7±5,1	31,0±14,8	31,0±0,0	21,0±6,6	26,3±5,5	12,3±6,8	22,3±2,1	16,0±14,4	25,7±3,1	23,0±4,4	19,7±4,5
	Lang 55	12,0±0,0	14,0±1,0	21,0±1,0	27,7±4,0	15,7±1,2	29,3±1,2	15,0±7,0	13,7±0,6	12,0±1,0	20,0±2,0	23,0±3,6	16,3±2,5
El Bendito	B-20V	15,7±3,2	21,0±6,1	24,0±3,5	22,7±4,0	19,3±2,9	21,0±1,7	9,0±1,0	18,3±1,5	23,7±3,1	23,7±1,2	16,3 ± 2,5	15,3±0,6
	B-25V	12,3±3,8	19,3±1,2	25,0±4,6	24,7±2,5	20,3±0,6	20,7±1,2	13,7±6,4	20,0±4,4	21,7±3,8	22,3±2,5	17,0 ± 2,0	17,0±1,0
	B-44V	13,3±2,1	17,0±1,0	23,0±3,5	24,0±2,6	18,7±2,3	16,7±1,5	14,3±5,0	15,7±3,1	20,3±2,5	27,7±2,5	14,0 ± 1,7	14,7±0,6
	45L	12,0±2,0	14,3±2,5	28,7±1,5	28,7±2,9	27,0±2,0	32,0±2,0	12,3±3,2	20,3±1,5	27,0±5,2	26,3±4,0	21,3±0,6	12,3±2,1
	B-48V	9,3±0,6	16,0±1,7	22,0±6,6	21,3±1,5	18,7±1,2	17,3±3,2	9,0±0,0	16,0±3,5	23,3±4,2	21,0±1,7	19,0 ± 2,6	15,3±0,6
	50	11,7±2,5	15,3±3,2	32,7±3,5	23,0±3,6	27,0±4,6	28,0±3,6	11,3±2,1	15,3±2,3	22,0±4,6	26,3±3,8	27,0±5,3	16,3±1,5
	56	20,0±4,0	22,0±4,0	25,7±2,1	30,0±2,0	31,3±1,5	24,0±2,0	10,0±0,0	12,0±1,0	20,7±1,5	25,0±0,0	26,7±2,1	18,7±2,5
	67	13,0±2,6	18,0±4,0	26,0±5,3	26,0±1,7	25,7±2,5	26,0±2,6	12,3±1,5	18,7±0,6	24,0±2,0	25,0±5,6	22,0±2,0	13,3±2,1
	B-72V	13,0±11,4	25,3±0,6	23,7±4,7	35,7±2,5	20,3±2,5	21,3±3,1	11,0±2,0	23,0±2,0	23,0±3,5	29,3±1,5	24,7 ± 0,6	16,3±0,6
Desembocadura del río Tumbes	BV-40	0,0±0,0	26,3±1,5	26,3±0,6	26,3±1,5	12,0±1,0	19,3±0,6	15,0±1,0	17,0±1,0	22,0±1,0	26,3±3,2	23,3±1,5	24,3±4,0
	BV-46	0,0±0,0	17,8±0,6	26,7±1,5	23,7±4,0	17,7±0,6	17,0±1,0	15,3±0,6	22,7±6,1	22,7±0,6	24,3±4,0	22,3±7,4	36,7±1,5
	BV-47	0,0±0,0	17,3±1,0	25,7±1,2	25,3±5,0	15,0±1,0	20,0±1,0	16,0±1,0	20,0±2,0	21,3±0,6	15,0±1,0	16,0±1,0	22,7±2,1
	BV-49	0,0±0,0	13,5±0,6	21,3±1,5	20,3±0,6	17,3±0,6	15,3±0,6	15,0±1,0	20,0±0,0	15,0±1,0	20,0±0,0	16,7±0,6	21,3±2,1
	BV-50	0,0±0,0	17,5±2,1	25,7±0,6	26,3±3,1	13,7±1,5	20,3±0,6	10,7±0,6	16,7±0,6	24,3±1,2	16,3±0,6	17,0±1,0	22,3±2,5
	BV-75	0,0±0,0	24,2±1,0	23,3±1,5	22,7±1,2	21,0±1,0	16,3±0,6	16,0±1,0	23,0±1,7	20,3±0,6	23,3±1,5	16,7±0,6	27,7±0,6
	BV-78	0,0±0,0	12,3±0,6	22,7±1,2	24,7±5,1	15,7±0,6	17,7±0,6	16,0±1,0	19,3±0,6	20,7±0,6	23,7±2,5	20,0±0,0	24,7±1,5

4.9. Resistencia antibiótica de cepas bacterianas aisladas de cangrejos y langostinos silvestres.

En la tabla 23 se observa que todas las cepas de *Vibrio* spp. aisladas de cangrejos fueron sensibles al cloranfenicol y la mayoría fueron sensibles al florfenicol, oxitetraciclina, tetraciclina y norfloxacina. Adicionalmente la mayoría de las cepas de *Vibrio* spp. fueron resistentes para estreptomomicina; con respecto al índice MAR, este varió entre 0,0 y 0,33.

Se observó que 4 de las 17 cepas evaluadas (23,53%) fueron multirresistentes siendo las cepas 23 Hep, 53 Int y 14 Hep fueron resistentes a antibióticos a tres de las siete familias ensayadas correspondiente a la zona de El Bendito, mientras que la cepa 34 aislada de *Ucides occidentalis* proveniente de la zona de la desembocadura del río Tumbes fue resistente a cuatro de las siete familias antibióticas ensayadas.

Tabla 23. Resistencia antibiótica en *Vibrio* spp. aislados de *Ucides occidentalis*.

Zona	Cepa	Penicilinas	Fosfonatos	Fenicoles	Tetraciclinas	Aminoglucósidos		Quinolonas			Macrólidos	Número de antibióticos a los que es resistente	Número de familias antibióticas a las que Índice MAR	Multirresistencia	
		Ampicilinas (10µg)	Fosfomicina (50 µg)	Cloranfenicol (30µg)	Florfenicol (30µg)	Oxitetraciclina	Tetraciclina (30µg)	Estreptomomicina (10)	Gentamicina (10µg)	Ácido nalidixico	Norfloxacina (10µg)				Enrofloxacina (5 µg)
Puerto Pizarro	14 hep	S	S	S S	I S	R S	S	R S	S S	S	R	3	3	0,25	Si
	23 hep	I	R	S S	S S	R S	S	I S S	S S	R	3	3	0,25	Si	
	45 int	I	S	S S	S S	R R	R	R S S	S S	I	3	2	0,25	No	
	53 int	R	I	S S	S S	R R	R	S S R	S S R	I	4	3	0,33	Si	
El Bendito	4C	S	S	S S	S S	I S	S	I S S	S S	I	0	0	0,00	No	
	5B-hem	S	S	S S	S S	R S	S	S S S	S S	S	0	0	0,00	No	
	8C	S	I	S S	S S	S S	S	I S S	S S	S	0	0	0,00	No	
	9B-hem	S	S	S S	S S	I S	S	S I S	S S	S	0	0	0,00	No	
	14B-hep	S	S	S S	S S	I S	S	I S S	S S	R	1	1	0,08	No	
	15B-int	I	R	S S	S S	R S	S	S S S	S S S	S	2	2	0,16	No	
16B-int	I	I	S S	S S	I S	S	S S S	S S S	S	0	0	0,00	No		
Desembocadura del río Tumbes	21	I	I	S R	S S	R S	S	S S I	S S	I	I	1	1	0,08	No
	24	S	S	S S	I I	R S	S	R S I	S S	I	I	2	2	0,16	No
	30	R	S	S S	S S	R S	S	S S S	S S	S	S	2	2	0,16	No
	34	R	R	S S	S S	R I	S	S S R	S S R	I	I	4	4	0,33	Si
	41	S	S	S S	S S	I S	S	S S I	S S	I	I	0	0	0,00	No
48	S	R	S S	S S	S S	S	S S S	S S S	S	S	1	1	0,08	No	
Cepas resistentes		3	4	0 1	0 0	10 2	2	3 0 2	3 0 2	3					

Las cepas que mostraron mayor resistencia antibiótica fueron las cepas 53 int y 37 que correspondió a *Vibrio alginolyticus* también mostró una alta multirresistencia a

antibióticos; cepas de dicha especie han sido reportadas anteriormente en cangrejos del manglar, particularmente en el cangrejo del manglar brasileño *U. cordatus*, en el cual entre 78 a 86% fueron resistentes a ampicilina (Carvalho et al., 2016), adicionalmente Vieira et al. (2004), también reportaron cepas de esta especie resistente a antibióticos. Algunas cepas de *Vibrio alginolyticus* han sido reportadas como patógenas para peces y crustáceos, en particular de langostinos en cultivo (Liao et al., 2022) así como implicadas en infecciones a la piel en personas que se introducen en ambientes acuáticos en donde se hallan éstas (Vieira et al., 2004). Un estudio en una langostineras de Tumbes mostró que *V. alginolyticus* tuvo resistencia a antibióticos principalmente a ampicilina, tetraciclina y cloranfenicol (Rosado, 2018) .

En la tabla 24 se observa que todas las cepas de *Vibrio* spp. aisladas de langostinos silvestres fueron sensibles al cloranfenicol y florfenicol, mientras que la mayoría de cepas fueron sensibles al ácido nalidíxico, gentamicina y norfloxacin, por otro lado, la mayoría de las cepas fueron resistentes a la ampicilina y en menor proporción a estreptomicina y fosfomicina. El índice MAR vario entre 0,08 y 0,25.

Se observó que 3 de las 14 cepas ensayadas (21,4%) fueron multirresistentes siendo la cepa Lang 55 resistente a antibióticos de tres de las siete familias evaluadas.

En esta investigación tres cepas fueron multirresistentes siendo las cepas Lang 55, B-48V y BV-50 las mismas que fueron identificadas como *Vibrio alginolyticus*; puesto que en varias investigaciones como las de Aguirre et al. (2021); Grande Avalos (2020); Rosado (2018) y Tinoco (2020), se ha evidenciado que existen cepas de *Vibrio* resistentes e incluso multirresistentes a antibióticos en langostineras aledañas al manglar de Tumbes; sin embargo, los patrones de resistencia fueron distintas entre todas ellas, indicando que la resistencia y multirresistencia en estas cepas bacterianas es variable.

Tabla 24. Resistencia antibiótica de *Vibrio* spp. aislados de langostinos silvestres.

Zona	Cepa	Peni- cilinas	Fosfo- natos	Feni- coles	Tetraci- clinas		Aminoglu- cósidos		Quinolonas			Macró- lidos	Número de antibióticos a los que es resistente	Número de familias antibióticas a las que resiste	Índice MAR	Multiresistencia
		Ampicilinas (10µg)	Fosfomicina (50 µg)	Cloranfenicol (30µg) Florfenicol (30µg)	Oxitetraciclina (30µg) Tetraciclina (30µg)	Estreptomina (10 µg) Gentamicina (10µg)	Ácido nalidixico (30µg) Norfloxacina (10µg) Enrofloxacina (5 µg)	Azitromicina (15 µg)								
Puerto Pizarro	1-PV	R	S	S S	S S	R S	S S	S S S	S	2	2	0,16	No			
	Lang 39	R	R	S S	I S	R S	I S S	I	3	3	0,25	Si				
	Lang 55	R	R	S S	I S	I I	R S S	I	3	3	0,25	Si				
El Bendito	B-20V	I	S	S S	S S	R S	S S I	I	1	1	0,08	No				
	B-25V	R	I	S S	S S	I S	S S I	S	1	1	0,08	No				
	B-44V	R	I	S S	S I	I S	S S R	I	2	2	0,16	No				
	B-48V	R	R	S S	S I	R S	S S I	I	3	3	0,25	Si				
	B-72V	R	S	S S	S S	R S	S S S	I	2	2	0,16	No				
Desembocadura del río Tumbes	BV-40	R	S	S S	R S	I S	S S S	S	2	2	0,16	No				
	BV-47	R	I	S S	I S	I S	S I I	S	1	1	0,08	No				
	BV-49	R	R	S S	I I	I S	I S I	S	2	2	0,16	No				
	BV-50	R	I	S S	R S	R S	S I I	S	3	3	0,25	Si				
	BV-75	R	S	S S	S I	I S	S S I	S	1	1	0,08	No				
	BV-78	R	R	S S	I I	I S	S S I	S	2	2	0,16	No				
Cepas resistentes		13	5	0 0	2 0	6 0	1 0 1	0								

En la tabla 25 se muestra la resistencia antibiótica de cepas de *Staphylococcus* spp. y *Enterobacter* spp. aisladas de *Ucides occidentalis*, de manera similar en la tabla 26, se observa la resistencia antibiótica de cepas de los mismos géneros aisladas de langostinos silvestres. La cepa que mostró mayor resistencia a antibióticos fue la cepa 56 hep (aislada del hepatopáncreas de *U. occidentalis*) que correspondió a *Staphylococcus epidermidis*, la misma que resistió a cuatro de los 12 antibióticos ensayados que fueron la ampicilina, oxitetraciclina, enrofloxacina y azitromicina; además ésta cepa fue la que mayor índice de multiresistencia tuvo. Esta situación no es infrecuente para cepas de esta especie, pues según ha reportado Otto (2009), estas bacterias, son comensales en la piel humana y pueden comportarse como patógenos oportunistas. Además, portan genes de resistencia a antibióticos de las familias penicilinas, aminoglucósidos y quinolonas, tal como se ha observado en la cepa mencionada.

Tabla 25. Resistencia antibiótica de *Staphylococcus* spp. y *Enterobacter* spp. aisladas de *Ucides occidentalis*.

Zona	Cepa	Peni- cilinas	Fosfo- natos	Feni- coles	Tetra- ciclinas	Amino- glucósidos	Quinolonas	Macró- lidos	Número de antibióticos a los que es resistente	Número de familias antibióticas a las que resiste	Índice MAR	Multirresistencia
		Ampicilinas (10µg)	Fosfomicina (50 µg)	Cloranfenicol (30µg) Florfenicol (30µg)	Oxitetraciclina (30µg) Tetraciclina (30µg)	Estreptomina (10 Gentamicina (10µg)	Ácido nalidixico Norfloxacina (10µg) Enrofloxacina (5 µg)	Azitromicina (15 µg)				
Puerto Pizarro	40 Int**	S	R	S ND	S S	R S	I S S	R	3	3	0,16	Si
	49 Int**	S	R	S ND	S S	S S	S S S	S	1	1	0,09	No
	50 Int*	S	ND***	S S	S S	S S	ND ND S	S	0	0	0,00	No
	52 Int*	S	ND	S S	S S	I S	ND ND S	R	1	1	0,11	No
	56 Hep*	R	ND	S S	R I	S S	ND ND R	R	4	4	0,44	Si
El Bendito	12B-Hep*	S	ND	S S	S S	S S	ND ND S	I	0	0	0,00	No
Cepas resistentes		1	2	0 0	1 0	1 0	0 0 1	3				

* *Staphylococcus* spp.

** *Enterobacter cloacae*

*** ND: No se pudo determinar pues no existen puntos de corte establecidos en la literatura científica para el antibiótico y el género bacteriano indicado.

Tabla 26. Resistencia antibiótica de *Staphylococcus* spp. y *Enterobacter* spp. aisladas de langostinos silvestres.

Zona	Cepa	Peni- cilinas	Fosfo- natos	Feni- coles	Tetra- ciclinas	Amino- glucósidos	Quinolonas	Macró- lidos	Número de antibióticos a los que es resistente	Número de familias antibióticas a las que resiste	Índice MAR	Multirresistencia
		Ampicilinas (10µg)	Fosfomicina (50 µg)	Cloranfenicol (30µg) Florfenicol (30µg)	Oxitetraciclina (30µg) Tetraciclina (30µg)	Estreptomina (10 Gentamicina (10µg)	Ácido nalidixico Norfloxacina (10µg) Enrofloxacina (5 µg)	Azitromicina (15 µg)				
Puerto Pizarro	Lang 53*	I	ND***	S S	S S	S S	ND ND S	S	0	0	0,00	No
El Bendito	45L**	R	R	S ND	S S	I S	S S S	R	3	3	0,27	Si
	67**	R	S	S ND	S S	I S	S S S	R	2	2	0,18	No
	50**	R	R	S ND	S S	R S	S S S	S	3	3	0,27	Si
	56**	S	S	S ND	S S	R R	S S S	S	2	1	0,09	No
Cepas resistentes		2	2	0 0	0 0	2 1	0 0 0	2				

* *Staphylococcus capitis*.

** *Enterobacter cloacae*

***ND: No se pudo determinar pues no existen puntos de corte establecidos en la literatura científica para el antibiótico y el género bacteriano indicado.

En la tabla 27 se aprecia la resistencia antibiótica de *Bacillus* spp. aislados de *Ucides occidentalis*; sin embargo, se cabe mencionar que de todas las cepas identificadas solo se identificó el género *Bacillus* en cepas bacterianas aisladas de

cangrejos, puesto que no se encontró ninguna cepa de *Bacillus* en cepas bacterianas aislados de langostinos silvestres; siendo Puerto Pizarro y El Bendito lugares de recolección de cangrejos donde se evidenció presencia de este género.

Tabla 27. Resistencia antibiótica de *Bacillus* spp. de cangrejos del manglar.

Zona	Cepa	Penicilinas	Fosfonatos	Fenicoles		Tetraciclinas		Aminoglucósidos		Quinolonas			Macrólidos	Número de antibióticos a los que es resistente	Número de familias antibióticas a las que es resistente	Índice MAR	Multirresistencia
		Ampicilinas (10µg)	Fosfomicina (50 µg)	Cloranfenicol (30µg)	Flofenicol (30µg)	Oxitetraciclina (30µg)	Tetraciclina (30µg)	Estreptomina (10 µg)	Gentamicina (10µg)	Ácido nalidixico (30µg)	Norfloxacina (10µg)	Enrofloxacin (5 µg)	Azitromicina (15 µg)				
A	3 hem	I	ND	S	S	S	S	S	S	ND	ND	S	S	0	0	0,00	No
	20 hep	S	ND	S	S	S	S	S	S	ND	ND	S	S	0	0	0,00	No
	46 hem	S	ND	S	S	S	S	S	S	ND	ND	S	R	1	1	0,11	No
	48 hem	S	ND	S	S	S	S	S	S	ND	ND	S	I	0	0	0,00	No
	54 int	I	ND	S	S	S	S	S	S	ND	ND	S	R	1	1	0,11	No
	55 hep	S	ND	S	S	S	S	S	R	ND	ND	S	R	2	2	0,22	No
B	20	S	ND	S	S	S	S	S	S	ND	ND	I	I	0	0	0,00	No
	32	S	ND	S	S	S	I	S	S	ND	ND	S	I	0	0	0,00	No
	37	S	ND	S	S	S	S	S	S	ND	ND	S	S	0	0	0,00	No
	49	S	ND	S	S	S	I	S	S	ND	ND	S	I	0	0	0,00	No

A: Puerto Pizarro; B: Desembocadura del río Tumbes.

Se evaluó la resistencia antibiótica de 10 cepas de *Bacillus* spp. contra 12 antibióticos. La cepa 55 hep resistió a dos antibióticos (gentamicina y azitromicina) y dos cepas (46 hem y 54 int) resistieron a un antibiótico (azitromicina) de los 12 antibióticos ensayados. La mayoría de las cepas fueron sensibles, ocho de ellas no resistieron a ninguno de los 12 antibióticos ensayados; así mismo, para la evaluación de la resistencia antibiótica de *Bacillus* spp. se utilizaron los puntos de corte de estafilococos debido a que no existen los mismos establecidos por el Eucast. Esta decisión es respaldada por Adamski et al. (2023) quienes utilizaron los puntos de corte de estafilococos para evaluar la resistencia antibiótica de *Bacillus* spp. aislados de leche cruda. Por otro lado, Wiśniewski et al. (2022) también utilizaron los puntos de corte de estafilococos, para determinar la resistencia antibiótica de *Listeria monocytogenes* aislados en alimentos. Por ende, es posible determinar la resistencia antibiótica de *Bacillus* spp. como ya se ha evidenciado en investigaciones anteriores.

4.10. Porcentaje de resistencia antibiótica de cepas bacterianas en cangrejos y langostinos silvestres.

En la tabla 28 se observa el porcentaje de cepas de *Vibrio* spp. aisladas de cangrejos del manglar que fueron resistentes o sensibles a cada antibiótico, apreciándose que el 100% de las cepas fueron sensibles al cloranfenicol, mientras que el 94,1% lo fueron para florfenicol, tetraciclina y norfloxacina. La mayor resistencia se observó para la estreptomina (58,8%), seguido la fosfomicina (23,5%) y en menor proporción la ampicilina, ácido nalidíxico y azitromicina (17,6%).

Tabla 28. Porcentaje de resistencia antibiótica de cepas de *Vibrio* spp. aislados de *Ucides occidentalis*.

Antibiótico	Resistente		Intermedia		Sensible	
	n	%	n	%	n	%
Ampicilina	3	17,6	5	29,4	9	52,9
Fosfomicina	4	23,5	4	23,5	9	52,9
Cloranfenicol	0	0,0	0	0,0	17	100,0
Florfenicol	1	5,9	0	0,0	16	94,1
Oxitetraciclina	0	0,0	2	11,8	15	88,2
Tetraciclina	0	0,0	1	5,9	16	94,1
Estreptomina	10	58,8	5	29,4	2	11,8
Gentamicina	2	11,8	1	5,9	14	82,4
Ácido nalidíxico	3	17,6	4	23,5	10	58,8
Norfloxacina	0	0,0	1	5,9	16	94,1
Enrofloxacin	2	11,8	4	23,5	11	64,7
Azitromicina	3	17,6	7	41,2	7	41,2

Como se evidencia, las cepas ensayadas tuvieron alta resistencia a la estreptomina (58,8%). Aguirre (2019), también encontró cepas de *Vibrio* spp. aislados de *Litopenaeus vannamei* en langostineras de Tumbes y Santa Rosa (Ecuador) que tuvieron alta resistencia a la gentamicina (64,3%), un antibiótico aminoglucósido de la misma familia que la estreptomina.

El hecho que no se haya encontrado un nivel elevado de resistencia a antibióticos comúnmente utilizados para el tratamiento de enfermedades infecciosas que atacan el cultivo de langostino como la oxitetraciclina, enrofloxacin o el florfenicol, es un acontecimiento que puede justificarse en base al estudio de De Cock et al. (2022), los cuales encontraron un bajo nivel de residuos antibióticos, tales como

florfenicol y oxitetraciclina en la carne de cangrejo del manglar del Guayas, esto a pesar que en la zona existen muchas empresas langostineras que usan tales antibióticos, esto indica que si los residuos de tales antibióticos son bajos, no hay presión selectiva que conduzca a la resistencia de cepas bacterianas a tales antibióticos.

En la figura 2 se muestra las cepas de *Vibrio* que fueron multirresistentes a diferentes familias antibióticas; en éste se observa que la cepa 34 aislada de cangrejos del manglar de la zona de la desembocadura del río Tumbes fue multirresistente por el motivo que resistió a 4 familias de antibióticos tales como penicilinas, fosfonatos, aminoglucósidos y quinolonas; mientras que las cepas 23 hep, 53 int y 14 hep aisladas de *U. occidentalis* de la zona de El Bendito fueron resistentes a tres familias de antibióticos.

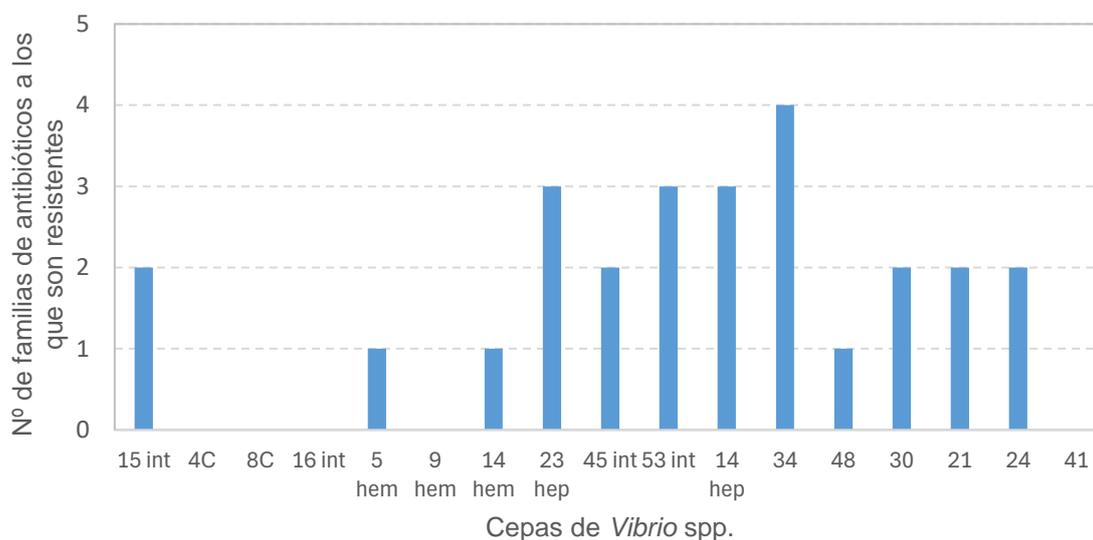


Figura 2. Número de familias antibióticas a las que fueron resistentes las cepas de *Vibrio* spp. asilados de *Ucides occidentalis*.

En la tabla 29 se observa el porcentaje de resistencia antibiótica en *Vibrio* spp. aislados de langostinos silvestres del manglar de Tumbes, donde se evidencia que el 100% fueron sensibles para cloranfenicol y florfenicol, seguido la gentamicina (92,9%) y norfloxacin (85,7%); mientras que el 92,9% fueron resistentes para la ampicilina, seguido la estreptomicina (42,9%) y fosfomicina (35,7%).

Tres de las cepas: Lang 55, 48 y BV-50, fueron resistentes a tres familias de antibióticos (figura 3).

Tabla 29. Porcentaje de resistencia antibiótica de *Vibrio* spp. aislados de langostinos silvestres.

Antibiótico	Resistente		Intermedia		Sensible	
	n	%	n	%	n	%
Ampicilina	13	92,9	1	7,1	0	0,0
Fosfomicina	5	35,7	4	28,6	5	35,7
Cloranfenicol	0	0,0	0	0,0	14	100,0
Florfenicol	0	0,0	0	0,0	14	100,0
Oxitetraciclina	2	14,3	5	35,7	7	50,0
Tetraciclina	0	0,0	5	35,7	9	64,3
Estreptomicina	6	42,9	8	57,1	0	0,0
Gentamicina	0	0,0	1	7,1	13	92,9
Ácido nalidíxico	1	7,1	2	14,3	11	78,6
Norfloxacin	0	0,0	2	14,3	12	85,7
Enrofloxacin	1	7,1	8	57,1	5	35,7
Azitromicina	0	0,0	6	42,9	8	57,1

Como ya se ha mencionado que la mayor resistencia antibiótica fue para ampicilina (92,9%) y estreptomicina (42,9%). Estos resultados son similares a los encontrados por Aguirre (2019), en langostinos de cultivo en Santa Rosa (Ecuador), quien observó que las cepas de *Vibrio* spp. aisladas de *L. vannamei* fueron resistentes a la fosfomicina (75%), ampicilina (57,1%) y estreptomicina (64,3%); lo que muestra que cepas resistentes a tales antibióticos son comunes en el manglar de Tumbes y del sur del Ecuador

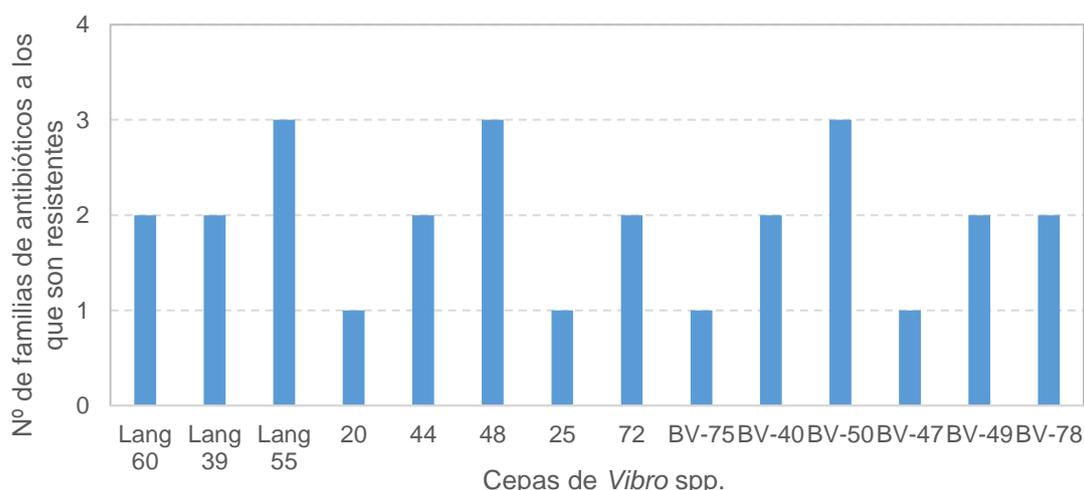


Figura 3. Número de familias antibióticas a las que fueron resistentes las cepas de *Vibrio* spp. aislados de langostinos silvestres.

4.11. Residuos de antibióticos en la parte comestible de cangrejos y langostinos silvestres.

En la tabla 30 se observa la concentración de residuos antibióticos en cangrejos y langostinos. Todas las muestras de la parte comestible del cangrejo del manglar y de los tejidos del cefalotórax del langostino, tuvieron concentraciones de tetraciclinas no detectables (<0,0044 ng/g); sin embargo en el caso de la parte comestible de los langostinos, las muestras colectadas en El Bendito y Puerto Pizarro, tuvieron concentraciones detectables, que fueron de 0,0700 ng/g y de 0,0482 ng/g

Tabla 30. Concentración de residuos antibióticos en tejidos de cangrejos del manglar y langostinos.

Muestra	Zona	Concentración de antibióticos (ng/g)
Parte comestible de langostino	Santuario Nacional Los Manglares de Tumbes	<0,0044*
	El Bendito	0,0700
	Puerto Pizarro	0,0482
	Desembocadura del río Tumbes	<0,0044
Parte comestible de cangrejo del manglar	Santuario Nacional Los Manglares de Tumbes	<0,0044
	El Bendito	<0,0044
	Puerto Pizarro	<0,0044
	Desembocadura del río Tumbes	<0,0044
Tejidos del cefalotórax de langostino (no incluye exoesqueleto)	Santuario Nacional Los Manglares de Tumbes	<0,0044
	El Bendito	<0,0044
	Puerto Pizarro	<0,0044
	Desembocadura del río Tumbes	<0,0044

*El valor <0,0044 ng/g fue asignado por el equipo, debido a que dicho valor es el límite mínimo de detección del mismo.

Puesto que en el Perú ya existen diferentes legislaciones que establecen límites máximos de residuos (LMR), mediante la Norma Técnica Sanitaria N° 120-Minsa/Digesa v.01. Norma que estable los límites máximos de residuos (LMR) de medicamentos veterinarios en alimentos para consumo humano (Digesa, 2016), ha establecido que, en el músculo de peces y crustáceos para consumo humano, el límite máximo de residuos de clortetraciclina, tetraciclina y oxitetraciclina es de 200 µg/kg (equivalente a 200 ng/g), mientras que en el caso de los mismos antibióticos más sus 4-epímeros, en músculo y piel es de 100 µg/kg (equivalente a 100 ng/g).

Los valores establecidos en esta norma son similares al indicado por el *Codex Alimentarius* (Codex Alimentarius Commission, 2018), en el caso del músculo del crustáceo *Penaeus monodon* que es de 200 µg/kg.

Sin embargo, la Unión Europea ha establecido un límite máximo de residuos más bajo para productos cárnicos. En su informe EMEA/MRL/023/95 menciona que el LMR es de 100 µg/kg para oxitetraciclina, tetraciclina y clortetraciclina y sus 4-epímeros.

Los resultados observados, indican que la concentración de residuos antibióticos tanto en cangrejos del manglar como en langostinos silvestres (que fueron en su mayoría indetectables, con la excepción de dos muestras que tuvieron concentración de 0,0700 ng/g y de 0,0482 ng/g), no excedieron los límites máximos establecidos, por lo que son seguros para el consumidor y no deberían afectar su salud.

4.12. Genes de resistencia en cepas bacterianas.

De las 35 cepas bacterianas aisladas de *U. occidentalis* y que fueron identificadas molecularmente, solo crecieron 27 y fueron viables para el análisis de detección de residuos antibióticos; ocho cepas no crecieron y no pudieron ser analizadas (cepas 34, 37, 30, 21, 20, 32, 24 y 41). Los resultados del análisis (tabla 31) mostraron que ninguna cepa presentó los genes de resistencia antibiótica (ARGs) para tetraciclinas: *tetA*, *tetB*, *tetD* y *tetE*.

Tabla 31. Genes de resistencia antibiótica de tetraciclinas en cepas seleccionadas de *Ucides occidentalis*.

Zona de muestreo	Cepa	Especie	ARGs de tetraciclinas			
			<i>tetA</i>	<i>tetB</i>	<i>tetD</i>	<i>tetE</i>
Puerto Pizarro	50 int	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	-	-	-	-
	56 hep	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-	-	-
	3 hem	<i>Bacillus valezaensis</i>	-	-	-	-
	23 hep	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-	-	-	-
	45 int	<i>Vibrio alginolyticus</i>	-	-	-	-
	53 int	<i>Vibrio alginolyticus</i>	-	-	-	-
	52 int	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-	-	-
	20 hep	<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-
	55 hep	<i>Bacillus spp</i>	-	-	-	-
	49 int	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-	-
	48 hem	<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-
	14 hep	<i>Vibrio natriegens</i>	-	-	-	-
	46 hem	<i>Bacillus spp.</i>	-	-	-	-
	54 int	<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-
	40 int	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-	-
El Bendito	15B-int	<i>Vibrio alginolyticus</i>	-	-	-	-
	4C	<i>Vibrio fortis</i>	-	-	-	-
	8C	<i>Vibrio fortis</i>	-	-	-	-
	16C	<i>Halomonas spp.</i>	-	-	-	-
	16B-int	<i>Vibrio alginolyticus</i>	-	-	-	-
	5B-hem	<i>Vibrio alginolyticus</i>	-	-	-	-
	9B-hem	<i>Vibrio rotiferianus</i>	-	-	-	-
	12B-hep	<i>Staphylococcus hominis</i>	-	-	-	-
	14B-hep	<i>Vibrio alginolyticus</i>	-	-	-	-
Desembocadura del río Tumbes	48	<i>Vibrio alginolyticus</i>	-	-	-	-
	28	<i>Exiguobacterium profundum</i>	-	-	-	-
	49	<i>Priestia (Bacillus) endophytica</i>	-	-	-	-

Por su parte, de las 23 cepas bacterianas aisladas de *U. occidentalis* y que fueron identificadas molecularmente, solo crecieron 21, las que pasaron al análisis de detección de residuos antibióticos; en tanto que dos cepas no crecieron y no pudieron ser analizadas (cepas Lang 35 y Lang 27). Los resultados del análisis (tabla 32) de igual manera mostraron que ninguna cepa presentó los genes de resistencia antibiótica (ARGs) para las tetraciclinas *tetA*, *tetB*, *tetD* y *tetE*.

Tabla 32. Genes de resistencia antibiótica de tetraciclinas en cepas seleccionadas de langostinos silvestres.

Zona de muestreo	Cepa	Especie	ARGs de tetraciclinas			
			<i>tetA</i>	<i>tetB</i>	<i>tetD</i>	<i>tetE</i>
Puerto Pizarro	1-PV	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-	-	-	-
	Lang 53	<i>Staphylococcus capitis</i>	-	-	-	-
	Lang 39	<i>Vibrio alginolyticus</i>	-	-	-	-
	Lang 55	<i>Vibrio alginolyticus</i>	-	-	-	-
	Lang 46	ND*	-	-	-	-
El Bendito	B-20V	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-	-	-	-
	B-44V	<i>Vibrio alginolyticus</i>	-	-	-	-
	B-48V	<i>Vibrio alginolyticus</i>	-	-	-	-
	B-25V	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-	-	-	-
	B-72V	<i>Vibrio proteolyticus</i>	-	-	-	-
	45L	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-	-
	67	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-	-
	50	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-	-
56	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-	-	
Desembocadura del río Tumbes	BV-75	<i>Vibrio diabolicus</i>	-	-	-	-
	BV-40	<i>Vibrio furnissi</i>	-	-	-	-
	BV-50	<i>Vibrio alginolyticus</i>	-	-	-	-
	BV-46	<i>Shewanella algae</i>	-	-	-	-
	BV-47	<i>Vibrio alginolyticus</i>	-	-	-	-
	BV-49	<i>Vibrio harveyi</i>	-	-	-	-
	BV-78	<i>Vibrio alginolyticus</i>	-	-	-	-

* ND: No se pudo identificar a la especie a nivel molecular

A pesar que no se ha encontrado presencia de genes de tetraciclinas (*tetA*, *tetB*, *tetD* y *tetE*) en cepas bacterianas aisladas de *Ucides occidentalis* y langostinos silvestres, ello no descarta la posibilidad de que las cepas evaluadas aún puedan tener genes de resistencia a antibioticos diferentes a las tetraciclinas; pues, en otras investigaciones como la de Gao et al. (2012), realizada en bacterias aisladas de granjas acuícolas en el norte de China, donde no se encontraron genes de resistencia a tetraciclinas en cepas bacterianas, sin embargo, si se detectaron genes de resistencia a sulfonamidas: *sul1* y *sul2* en bacterias: *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *B. megaterium* y *Acinetobacter lwoffii*; probablemente, por que las sulfonamidas se utilizaron con mayor frecuencia que las tetraciclinas en esas granjas acuícola.

Por otro lado, en la investigación de Luo et al. (2010) en China, se cuantificaron ARGs de tetraciclinas y sulfonamidas (*tetW*, *tetQ*, *tetO*, *tetT*, *tetM*, *tetB*, *tetS*, *sul1* y

sul2); en dicha investigación no se encontraron ARGs mediante PCR cuantitativa en la mayoría de las muestras. Sin embargo, los genes de resistencia a sulfonamidas: *sul1* y *sul2* estuvieron presentes en concentraciones altas en todas las muestras, debido que la población se medica con sulfonamidas que como consecuencia son expulsados como efluentes conduciendo a las zonas de muestreo de la citada investigación.

Como se ha evidenciado que existen trabajos en donde no se ha encontrado la presencia de ARGs a tetraciclina o se encuentran en bajas cantidades según cuantificación por qPCR; esto es por el motivo que muchos de los antibioticos están prohibidos para el uso veterinario (Dos Santos, 2015).

V. CONCLUSIONES

- 1) Se aislaron del cangrejo del manglar *Ucides occidentalis*, 53 cepas bacterianas en TCBS y 93 en TSA. Treinta y cinco cepas se identificaron, correspondiendo principalmente a *Vibrio* (17 cepas) y en menor número a *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Enterobacter*, *Halomonas* y *Exiguobacterium*.
- 2) Se aislaron de langostinos silvestres, 64 cepas bacterianas en TCBS y 68 cepas en TSA. Veinte de ellas fueron identificadas y correspondieron en su mayoría al género *Vibrio* y en menor cantidad a los géneros *Enterobacter*, *Staphylococcus* y *Shewanella*.
- 3) La mayoría de las cepas de *Vibrio* spp. aisladas de *U. occidentalis* fueron resistentes de 1 a 4 antibióticos de los 12 ensayados. Siendo el 58,8% resistentes a estreptomycin y 23,5% a fosfomicina. El 100% fueron sensibles al cloranfenicol, y en menor proporción al florfenicol, tetraciclina y norfloxacin (94,1%) y a la oxitetraciclina (88,2%). Tres cepas fueron multirresistentes.
- 4) Todas las cepas de *Vibrio* spp. aisladas de langostinos silvestres fueron resistentes de 1 a 3 antibióticos de los 12 evaluados. Siendo el 92,9% resistentes a ampicilina y el 42,9% a estreptomycin. El 100% fueron sensibles al cloranfenicol y florfenicol, y 92,9% a gentamicina. Tres cepas fueron multirresistentes.
- 5) En los tejidos de los cangrejos del manglar (*Ucides occidentalis*) y de los langostinos silvestres (*Litopenaeus vannamei*) recolectados en el manglar de Tumbes, los niveles de residuos antibióticos de tetraciclinas no excedieron el límite máximo de residuos (LMR) establecido en la legislación peruana e internacional.
- 6) Ninguna de las cepas bacterianas aisladas de cangrejos del manglar o de langostinos silvestres presentaron los genes de resistencia a tetraciclinas evaluados (*tetA*, *tetB*, *tetD* y *tetE*).

VI. RECOMENDACIONES

- 1) Dado que se ha observado en las cepas estudiadas resistencia a ampicilina y a estreptomicina, se debería investigar si en la zona existen residuos de tales antibióticos que superen los límites máximos permisibles establecidos en la legislación nacional o internacional.
- 2) De igual manera se debería evaluar si las cepas bacterianas presentes en cangrejos del manglar y langostinos silvestres portan ARGs para ampicilina, estreptomicina u otros antibióticos.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abrahamovich, E. (2018). *Estudios sobre la transferencia horizontal de resistencia a tetraciclina en bacterias esporuladas aisladas de colmenas de abejas melíferas* [Tesis de Doctor en Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata]. <https://doi.org/10.35537/10915/66598>
- Adamski, P., Byczkowska-Rostkowska, Z., Gajewska, J., Zakrzewski, A. J., & Kłębukowska, L. (2023). Prevalence and Antibiotic Resistance of *Bacillus* sp. Isolated from Raw Milk. *Microorganisms*, 11(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11041065>
- Aguirre, L. E. (2019). *Efecto del neem (Azadirachta indica) y orégano (Origanum vulgare) en el crecimiento de Vibrio spp. Resistentes a antibióticos, aislados de Litopenaeus vannamei* [Tesis de Ingeniero Pesquero, Universidad Nacional de Tumbes]. <http://repositorio.untumbes.edu.pe/handle/UNITUMBES/487>
- Aguirre, L. E., Sánchez-Suárez, H. A., & Ordinola-Zapata, A. (2021). Resistencia antibiótica en *Vibrio* spp aislados de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Alternativas de tratamiento con extractos de *Azadirachta indica* y *Origanum vulgare*. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 32(4), e19386. <https://doi.org/10.15381/rivep.v32i4.19386>
- Aidaros, H. A., Khalafallah, S. S., Diab, M. S., K. Alm Eldin, N., & E.K. El Bahgy, H. (2022). Influence of hygienic measures on enterobacteriaceae prevalence and antimicrobial resistance in poultry farms. *Advances in Animal and*

Veterinary Sciences, 10(10). <https://doi.org/10.17582/journal.aavs/2022/10.10.2228.2237>

- Alemán, S., Montero, P., Ordinola, E., & Guevara, M. (2019). Prospección biológico poblacional del cangrejo del manglar (*Ucides occidentalis*) en la región Tumbes, Perú. Diciembre 2016. *Informe del Instituto del Mar del Perú*, 46(2), 269-278.
- Alemán, S., & Ordinola, E. (2017). Ampliación de la distribución sur de *Ucides occidentalis* (Decapoda: Ucididae) y *Cardisoma crassum* (Decapoda: Gecarcinidae). *Revista Peruana de Biología*, 24(1), 107-110. <https://doi.org/10.15381/rpb.v24i1.13110>
- Alfaro, R., Guevara, M., & Gonzales, I. (2014). Prevalencia y distribución de los principales agentes etiológicos que afectan los langostinos silvestres en Tumbes, Perú. *Revista Peruana de Biología*, 17(3), 359-364.
- Alsina, M., & Blanch, A. R. (1994). A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species. *Journal of Applied Bacteriology*, 76(1), 79-85. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1994.tb04419.x>
- Alvarez, J., Austin, B., Alvarez, A., & Agurto, C. (2000). Especies de *Vibrio* y *Aeromonas* aisladas del intestino de camarones marinos sanos silvestres y cultivados en Venezuela. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias Instituto de Investigaciones Veterinarias (IIV), 25(1), 5-27. http://www.sian.inia.gob.ve/revistas_ci/VeterinariaTropical/vt2501/texto/jalvarez.htm
- Bahmani, K., Shahbazi, Y., & Nikousefat, Z. (2020). Monitoring and risk assessment of tetracycline residues in foods of animal origin. *Food Science and Biotechnology*, 29(3), 441-448. <https://doi.org/10.1007/s10068-019-00665-x>

- Baron, S., Lesne, J., Jouy, E., Larvor, E., Kempf, I., Boncy, J., Rebaudet, S., & Piarroux, R. (2016). Antimicrobial susceptibility of autochthonous aquatic *Vibrio cholerae* in Haiti. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01671>
- Blaser, M. J., Melby, M. K., Lock, M., & Nichter, M. (2021). Accounting for variation in and overuse of antibiotics among humans. *BioEssays*, 43(2), 2000163. <https://doi.org/10.1002/bies.202000163>
- Britania. (2021a). *T.C.B.S. medio*. Britania. https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_60709410a2736.pdf
- Britania. (2021b). *Tripteína soya agar*. Britania. https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_6054e7678b1e3.pdf
- Carvalho, M. C. N., Jayme, M. M., Arenazio, G. S., Araújo, F. V., Leite, S. G. F., & Del Aguila, E. M. (2016). Microbiological quality assessment by PCR and its antibiotic susceptibility in mangrove crabs (*Ucides cordatus*) from Guanabara Bay, Rio de Janeiro, Brazil. *International Journal of Microbiology*, 2016, 1-9. <https://doi.org/10.1155/2016/7825031>
- Cesasin. (2003). Técnicas de bacteriología, técnicas de bacteriología, análisis en fresco, calidad de agua y buenas prácticas de agua y buenas prácticas de manejo y bioseguridad en granjas camaroneras en granjas camaroneras. (1ra ed.). Cesasin.
- Chau, K. M., Van, T. T. H., Quyen, D. V., Le, H. D., Phan, T. H. T., Ngo, N. D. T., Vo, T. D. T., Dinh, T. T., Le, H. T., & Khanh, H. H. N. (2021). Molecular Identification and Characterization of Probiotic *Bacillus* Species with the Ability to Control *Vibrio* spp. *In Wild Fish Intestines and Sponges from the*

Vietnam Sea. Microorganisms, 9(9), 1927. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091927>

Chávez, M. C., & Higuera, I. (2003). *Manual de buenas prácticas de producción acuícola de camarón para la inocuidad alimentaria* (1ra ed.). Senacica. http://anfagal.org/media/Biblioteca_Digital/Acuicultura/JM-Manual-Camaron.pdf

Chen, Y.-A., Chiu, W.-C., Wang, T.-Y., Wong, H., & Tang, C.-T. (2024). Isolation and characterization of an antimicrobial *Bacillus subtilis* strain O-741 against *Vibrio parahaemolyticus*. *PLOS ONE*, 19(4), e0299015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0299015>

Chuquimarca, L. A. (2015). *Contenido de metales pesados (Hg, Pb, Cd), en el tejido blando del quelípedo y hepatopáncreas del cangrejo rojo (Ucides occidentalis), en tres localidades del perfil costero de la provincia de El Oro, 2014* [Tesis de Ingeniero Químico, Universidad Técnica de Machala]. <http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/2833/1/CD000022-TRABAJO%20COMPLETO-pdf>

Cisneros, G. C., & Sunció, L. R. (2019). Factores antrópicos que afectan la conservación del Santuario Nacional los Manglares de Tumbes, Sector Puerto 25—Ruta Turística 1 [Tesis de Licenciado en Turismo, Universidad Nacional de Tumbes]. <http://repositorio.untumbes.edu.pe/handle/20.500.12874/repositorio.untumbes.edu.pe/handle/20.500.12874/1921>

Clinical and Laboratory Standard Institute [CLSI]. (2016). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*

(23th edition). CLSI. https://clsi.org/media/3646/vet04ed3_sample.pdf

Clinical and Laboratory Standard Institute Clinical and Laboratory Standard Institute [CLSI]. (2020). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals. CLSI supplement vet04* (3rd edition). CLSI. https://clsi.org/media/3646/vet04ed3_sample.pdf

Codex Alimentarius Commission. (2018). *Maximum residue limits (MRLs) and risk management recommendations (RMRs) for residues of veterinary drugs in foods. CX/MRL 2-2018*. FAO-WHO. <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?Ink=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXM%2B2%252FMRL2e.pdf>

D'Costa, V. M., King, C. E., Kalan, L., Morar, M., Sung, W. W. L., Schwarz, C., Froese, D., Zazula, G., Calmels, F., Debruyne, R., Golding, G. B., Poinar, H. N., & Wright, G. D. (2011). Antibiotic resistance is ancient. *Nature*, *477*(7365), 457-461. <https://doi.org/10.1038/nature10388>

De Cock, A., Forio, M. A. E., Croubels, S., Granda-Dominguez, L., Jacxsens, L., Lachat, C., Roa-López, H., Ruales, J., Scheyvaert, V., Solis Hidalgo, M. C., Spanoghe, P., Tack, F., & Goethals, P. (2022). Health Risk-Benefit Assessment of the Commercial Red Mangrove Crab: Implications for a Cultural Delicacy *Science of The Total Environment*, *862*, 160737. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.160737>

De Silva, B. C. J., Hossain, S., Dahanayake, P. S., & Heo, G.-J. (2018). Frozen white-leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in korean markets as a source of

- Aeromonas spp. Harboring antibiotic and heavy metal resistance genes. *Microbial Drug Resistance*, 24(10), 1587-1598. <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0035>
- Deng, H., He, J., Feng, D., Zhao, Y., Sun, W., Yu, H., & Ge, C. (2021). Microplastics pollution in mangrove ecosystems: A critical review of current knowledge and future directions. *Science of the Total Environment*, 753, 142041. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142041>
- Dinh, Q. T., Munoz, G., Vo Duy, S., Tien Do, D., Bayen, S., & Sauvé, S. (2020). Analysis of sulfonamides, fluoroquinolones, tetracyclines, triphenylmethane dyes and other veterinary drug residues in cultured and wild seafood sold in Montreal, Canada. *Journal of Food Composition and Analysis*, 94, 103630. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103630>
- Dirección General de Salud Ambiental [Digesa]. (2016). *Norma técnica sanitaria N° 120-Minsa/Digesa v.01. Norma sanitaria que establece los límites máximos de residuos (LMR) de medicamentos veterinarios en alimentos de consumo humano.* Digesa. http://www.digesa.minsa.gob.pe/NormasLegales/Normas/RM_372-2016-MINSA.pdf
- Dos Santos, E. M. (2015). *Diversidade e perfil de resistência a antimicrobianos de bacterias isoladas em pisciculturas com diferentes densidades de estocagem.* [Dissertação de mestrado em Ciências Ambientais, Universidade Estadual do Oeste do Paraná]. https://tede.unioeste.br/bitstream/tede/1821/1/Edela_Boufleuer_2015.pdf
- Gao, P., Mao, D., Luo, Y., Wang, L., Xu, B., & Xu, L. (2012). Occurrence of sulfonamide and tetracycline-resistant bacteria and resistance genes in

- aquaculture environment. *Water Research*, 46(7), 2355-2364. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.02.004>
- Garza-Ramos, U., Silva-Sánchez, J., & Martínez-Romero, E. (2009). Genética y genómica enfocadas en el estudio de la resistencia bacteriana. *Salud Pública de México*, 51, s439-s446.
- Grande, F. J. (2020). *Caracterización molecular de la resistencia antimicrobiana de Vibrio spp. Aislado de langostinos blancos (Litopenaeus vannamei) cultivados en Tumbes* [Tesis de Maestro en Sanidad Acuícola, Universidad Peruana Cayetano Heredia]. https://repositorio.upch.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12866/8591/Caracterizacion_GrandeAvalos_Francisco.pdf
- Grenni, P., Ancona, V., & Barra, A. (2018). Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: A review. *Microchemical Journal*, 136, 25-39. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.02.006>
- Hanna, N., Sun, P., Sun, Q., Li, X., Yang, X., Ji, X., Zou, H., Ottoson, J., Nilsson, L. E., Berglund, B., Dyar, O. J., Tamhankar, A. J., & Stålsby Lundborg, C. (2018). Presence of antibiotic residues in various environmental compartments of Shandong province in eastern China: Its potential for resistance development and ecological and human risk. *Environment International*, 114, 131-142. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.02.003>
- Hernández, J. A. (2016). *Caracterización de la calidad de agua en un sistema intensivo de cultivo de camarón blanco Litopenaeus vannamei, en condiciones de alta salinidad con recambio de agua limitado* [Tesis de Maestro en Ciencias en Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales (Orientación en Acuicultura), Centro de Investigaciones Biológicas

- del Noroeste, S. C.]. http://dspace.cibnor.mx:8080/bitstream/handle/123456789/505/hernandez_j.pdf?sequence=1
- Imchen, M., Kumavath, R., Barh, D., Vaz, A., Góes-Neto, A., Tiwari, S., Ghosh, P., Wattam, A. R., & Azevedo, V. (2018). Comparative mangrove metagenome reveals global prevalence of heavy metals and antibiotic resistome across different ecosystems. *Scientific Reports*, 8(1), 11187. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29521-4>
- Jang, H. M., Cho, H. U., Park, S. K., Ha, J. H., & Park, J. M. (2014). Influence of thermophilic aerobic digestion as a sludge pre-treatment and solids retention time of mesophilic anaerobic digestion on the methane production, sludge digestion and microbial communities in a sequential digestion process. *Water Research*, 48, 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.06.041>
- Jang, H. M., Kim, Y. B., Choi, S., Lee, Y., Shin, S. G., Unno, T., & Kim, Y. M. (2018). Prevalence of antibiotic resistance genes from effluent of coastal aquaculture, South Korea. *Environmental Pollution*, 233, 1049-1057. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.10.006>
- Kesarcodi-Watson, A., Kaspar, H., Lategan, M. J., & Gibson, L. (2009). Two pathogens of Greenshell™ mussel larvae, *Perna canaliculus*: *Vibrio splendidus* and a *V. coralliilyticus/neptunius* -like isolate. *Journal of Fish Diseases*, 32(6), 499-507. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2009.01006.x>
- Khan, M., & Lively, J. A. (2020). Determination of sulfite and antimicrobial residue in imported shrimp to the USA. *Aquaculture Reports*, 18, 100529. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100529>

- León, M. C. (2015). *Caracterización físico-química, biológica y ecotoxicológica del agua residual de un hospital de la ciudad de Cuenca* [Tesis de Maestro en Toxicología Industrial y Ambiental, Universidad de Cuenca]. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/21222>
- Lešnik, U., Lukežič, T., Podgoršek, A., Horvat, J., Polak, T., Šala, M., Jenko, B., Harmrolfs, K., Ocampo-Sosa, A., Martínez-Martínez, L., Herron, P. R., Fujs, Š., Kosec, G., Hunter, I. S., Müller, R., & Petković, H. (2015). Construction of a new class of tetracycline lead structures with potent antibacterial activity through biosynthetic engineering. *Angewandte Chemie International Edition*, *54*(13), 3937-3940. <https://doi.org/10.1002/anie.201411028>
- Li, W., Li, Y., Zheng, N., Ge, C., & Yao, H. (2022). Occurrence and distribution of antibiotics and antibiotic resistance genes in the guts of shrimp from different coastal areas of China. *Science of the Total Environment*, *815*, 152756. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152756>
- Li, Y., Li, Q., Sun, X., Zhao, L., Fan, H., & Zhang, Y. (2017). Occurrence and distribution of antibiotic-resistant bacteria isolated in Gaoqiao mangrove wetland, China. *Journal of Antibiotics Research*, *1*(2). <https://doi.org/10.15744/2574-5980.1.202>
- Liu, K., Han, J., Li, S., Liu, L., Lin, W., & Luo, J. (2019). Insight into the diversity of antibiotic resistance genes in the intestinal bacteria of shrimp *Penaeus vannamei* by culture-dependent and independent approaches. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *172*, 451-459. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.01.109>
- Liu, X., Zhang, G., Liu, Y., Lu, S., Qin, P., Guo, X., Bi, B., Wang, L., Xi, B., Wu, F., Wang, W., & Zhang, T. (2019). Occurrence and fate of antibiotics and

- antibiotic resistance genes in typical urban water of Beijing, China. *Environmental Pollution*, 246, 163-173. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.12.005>
- Luo, Y., Mao, D., Rysz, M., Zhou, Q., Zhang, H., Xu, L., & J J Alvarez, P. (2010). Trends in antibiotic resistance genes occurrence in the Haihe River, China. *Environmental Science & Technology*, 44(19), 7220-7225. <https://doi.org/10.1021/es100233w>
- Magiorakos, A.-P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T., & Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3), 268-281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
- Maiti, S. K., & Chowdhury, A. (2013). Effects of anthropogenic pollution on mangrove biodiversity: A review. *Journal of Environmental Protection*, 4(12), 1428-1434. <https://doi.org/10.4236/jep.2013.412163>
- Mao, D., Yu, S., Rysz, M., Luo, Y., Yang, F., Li, F., Hou, J., Mu, Q., & Alvarez, P. J. J. (2015). Prevalence and proliferation of antibiotic resistance genes in two municipal wastewater treatment plants. *Water Research*, 85, 458-466. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.09.010>
- Maraki, S., Samonis, G., Rafailidis, P. I., Vouloumanou, E. K., Mavromanolakis, E., & Falagas, M. E. (2009). Susceptibility of urinary tract bacteria to fosfomycin.

- Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(10), 4508-4510.
<https://doi.org/10.1128/AAC.00721-09>
- Markley, J. L., & Wencewicz, T. A. (2018). Tetracycline-inactivating enzymes. *Frontiers in Microbiology*, 9(1058). <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.01058>
- Martínez, C. (2018). *Mecanismos emergentes de resistencia a antibióticos en enterobacterias de origen humano, animal y ambiental* [Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid]. <http://eprints.ucm.es/46375/1/T39569.pdf>
- Ministerio del Ambiente [Minam]. (2017). *Decreto Supremo N° 004-2017-MINAM. Aprueban estándares de calidad ambiental (ECA) para agua y establecen disposiciones complementarias*. Diario Oficial El Peruano. <https://www.minam.gob.pe/wp-content/uploads/2017/06/DS-004-2017-MINAM.pdf>
- Montero, P. (2019). Calidad ambiental de la bahía de Puerto Pizarro y del ecosistema de manglar, Tumbes, Perú. Junio 2009. *Boletín. Instituto del Mar del Perú*, 46(4), 636-660.
- Morán, B., & Hidalgo, A. (2018). Contaminantes en la bahía Puerto Pizarro. *Manglar*, 13(2), 33-42.
- Mughal, S. S., Bakhat, S., Noor, M. Q. ul H., Sohail, R., Taj, Y., Sarwar, S., Sutti, L., & Faheem, F. (2023). Fosfomycin resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from urinary tract infections in a tertiary care hospital. *Pakistan Journal of Medicine and Dentistry*, 12(1), 53-57. <https://doi.org/10.36283/PJMD12-1/010>

- Ng, L.-K., Martin, I., Alfa, M., & Mulvey, M. (2001). Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. *Molecular and Cellular Probes*, 15(4), 209-215. <https://doi.org/10.1006/mcpr.2001.0363>
- Nguyen, A., Le, B. V. Q., & Richter, O. (2020). The role of mangroves in the retention of heavy metal (chromium): A simulation study in the Thi Vai river catchment, Vietnam. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(5823). <https://doi.org/10.3390/ijerph17165823>
- Oldenkamp, R., Beusen, A. H. W., & Huijbregts, M. A. J. (2019). Aquatic risks from human pharmaceuticals—Modelling temporal trends of carbamazepine and ciprofloxacin at the global scale. *Environmental Research Letters*, 14(3), 034003. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/ab0071>
- Ordinola, E., Montero, P., Alemán, S. A., & Llanos, J. (2010). El cangrejo de los manglares *Ucides Occidentalis* (Ortman) en Tumbes, Perú. Primavera 2007. *Informe del Instituto del Mar del Perú*, 37(3-4), 151-159. <https://repositorio.imarpe.gob.pe/handle/20.500.12958/2017>
- Ordinola, E. (2022). Pesquería de invertebrados marinos y de manglar, Tumbes, Perú, 2018. *Informe del Instituto del Mar del Perú*, 49(1), 5-32.
- Ordinola, E., Alemán, S., & Montero, P. (2020). Cangrejo del manglar (*Ucides occidentalis*) en la región Tumbes, Perú. Octubre 2018. *Informe del Instituto del Mar del Perú*, 47(2), 317-326.
- Ordinola-Zapata, A., Vieyra-Peña, E. G., Ramírez-Segura, B. E., & Saavedra-Olivos, K. Y. (2018). Genetic diversity of *Ucides occidentalis* (Ortmann 1897) (Crustacea: Decapoda: Brachiura) based on 16S rRNA gene in Tumbes, Peru. *Scientia Agropecuaria*, 9(2), 259-267. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2018.02.11>

- Ordinola-Zapata, A., Vieyra-Peña, E. G., Ramírez-Segura, B. E., & Saavedra-Olivos, K. Y. (2020). Diversidad genética y estructura poblacional del cangrejo del manglar (*Ucides occidentalis*) en Tumbes, Perú. *Revista Veterinaria*, 31(1), 33-37. <http://dx.doi.org/10.30972/vet.3114615>
- Otto, M. (2009). Staphylococcus epidermidis—The «accidental» pathogen. *Nature Reviews Microbiology*, 7(8), 555-567. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2182>
- Pan, M., & Chu, L. M. (2016). Adsorption and degradation of five selected antibiotics in agricultural soil. *Science of the Total Environment*, 545-546, 48-56. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.12.040>
- Perry, J., Waglechner, N., & Wright, G. (2016). The prehistory of antibiotic resistance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(6), a025197. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025197>
- Petrovski, K., Grinberg, A., Williamson, N., Abdalla, M., Lopez-Villalobos, N., Parkinson, T., Tucker, I., & Rapnicki, P. (2015). Susceptibility to antimicrobials of mastitis-causing *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* and *Str. dysgalactiae* from New Zealand and the USA as assessed by the disk diffusion test. *Australian Veterinary Journal*, 93(7), 227-233. <https://doi.org/10.1111/avj.12340>
- Pfeffer, C., & Oliver, J. D. (2003). A comparison of thiosulphate-citrate-bile salts-sucrose (TCBS) agar and thiosulphate-chloride-iodide (TCI) agar for the isolation of *Vibrio* species from estuarine environments. *Letters in Applied Microbiology*, 36(3), 150-151. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2003.01280.x>
- Pham, T. T. H., Rossi, P., Dinh, H. D. K., Pham, N. T. A., Tran, P. A., Ho, T. T. K. M., Dinh, Q. T., & De Alencastro, L. F. (2018). Analysis of antibiotic multi-

- resistant bacteria and resistance genes in the effluent of an intensive shrimp farm (Long An, Vietnam). *Journal of Environmental Management*, 214, 149-156. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.02.089>
- Potosí, K. A. (2024). *Efecto de Bacillus spp. Aislados de Litopenaeus vannamei en la inhibición in vitro e in vivo de Vibrio spp.* [Tesis de Ingeniero Pesquero, Universidad Nacional de Tumbes]. <https://repositorio.untumbes.edu.pe/handle/20.500.12874/65088>
- Rivera, S. A. H., & Gándara, J. M. (2001). Aislamiento y caracterización de bacterias del género *Vibrio* de aguas contaminadas por hidrocarburos. *Foresta Veracruzana*, 3(1), 17-21.
- Rojas, A. A., Haws, M. C., & Cabanillas, J. A. (Eds.). (2005). *Buenas prácticas de manejo para el cultivo de camarón.* (1ra edición). The David and Lucile Packard Foundation. http://www.crc.uri.edu/download/PKD_good_mgt_field_manual.pdf
- Rosado, A. A. (2018). *Resistencia Antimicrobiana de bacterias del género Vibrio en langostino blanco (Litopenaeus vannamei) en centros de cultivo de la región Tumbes.* [Tesis de Médico Veterinario, Universidad Ricardo Palma]. <https://repositorio.urp.edu.pe/handle/20.500.14138/1686>
- Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals [RSPCA]. (2016). *Humane killing and processing of crustaceans for human consumption.* RSPCA. <https://kb.rspca.org.au/wp-content/uploads/2019/01/Humane-killing-of-crustaceans-for-human-consumption-%E2%80%93-RSPCA-Information-Paper-May-2018.pdf>
- Ruan, S., Luo, J., Zhang, T., Nordhaus, I., Diao, X., & Zhao, H. (2020). Spatial and seasonal variations of chloramphenicol resistance genes and their co-

- occurring analysis with bacteria in a typical mangrove area of Hainan island, China. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 233, 106541. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2019.106541>
- Sabir, M., Ennaji, M., & Cohen, N. (2013). *Vibrio aginolyticus*: An emerging pathogen of foodborne diseases. *International journal of science and technology*, 2, 302-309.
- Servicio Nacional de Áreas Naturales Protegidas [Sernanp]. (2017). *Plan Maestro: Santuario Nacional Los Manglares de Tumbes 2017—2021*. Sernanp. http://old.sernanp.gob.pe/sernanp/archivos/baselegal/Resoluciones_Presidenciales/2017/RP%20063-2017-SERNANP.compressed.pdf
- Sharma, L., Nagpal, R., Jackson, C. R., Patel, D., & Singh, P. (2021). Antibiotic-resistant bacteria and gut microbiome communities associated with wild-caught shrimp from the United States versus imported farm-raised retail shrimp. *Scientific Reports*, 11(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82823-y>
- Su, H., Hu, X., Xu, Y., Xu, W., Huang, X., Wen, G., Yang, K., Li, Z., & Cao, Y. (2018). Persistence and spatial variation of antibiotic resistance genes and bacterial populations change in reared shrimp in South China. *Environment International*, 119, 327-333. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.07.007>
- Suzuki, S., Nakanishi, S., Tamminen, M., Yokokawa, T., Sato-Takabe, Y., Ohta, K., Chou, H.-Y., Muziasari, W. I., & Virta, M. (2019). Occurrence of sul and tet(M) genes in bacterial community in Japanese marine aquaculture environment throughout the year: Profile comparison with Taiwanese and Finnish aquaculture waters. *Science of The Total Environment*, 669, 649-656. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.111>

- Takahashi, K., & Martínez, A. (2015). *Impacto de la variabilidad y cambio climático en el ecosistema de Manglares de Tumbes, Perú*. Instituto Geofísico del Perú - Ministerio del Ambiente.
- Tinoco, V. Y. (2020). *Potencial probiótico de bacterias ácido lácticas aisladas de Litopenaeus vannamei frente a Vibrio spp. Resistentes y sensibles a antibióticos*. [Tesis de Ingeniero Pesquero, Universidad Nacional de Tumbes]. <https://repositorio.untumbes.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12874/63483/TESIS%20-%20TINOCO%20ELIZALDE.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Tinoco, V. Y., Peralta-Ortiz, T., & Ordinola-Zapata, A. (2023). Inhibición in vitro e in vivo de *Vibrio* spp. Aislados del langostino *Litopenaeus vannamei* utilizando bacterias ácido lácticas nativas. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras - INVEMAR*, 52(1), 9-26. <https://doi.org/10.25268/bimc.invemar.2023.52.1.1156>
- Tsai, M.-Y., Lin, C.-F., Yang, W.-C., Lin, C.-T., Hung, K.-H., & Chang, G.-R. (2019). Health risk assessment of banned veterinary drugs and quinolone residues in shrimp through liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Applied Sciences*, 9(12), 2463. <https://doi.org/10.3390/app9122463>
- Van Boeckel, T. P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B. T., Levin, S. A., Robinson, T. P., Teillant, A., & Laxminarayan, R. (2015). Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(18), 5649-5654. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503141112>
- Van, T. T. H., Yidana, Z., Smooker, P. M., & Coloe, P. J. (2020). Antibiotic use in food animals worldwide, with a focus on Africa: Pluses and minuses. *Journal*

- of *Global Antimicrobial Resistance*, 20, 170-177. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.07.031>
- Varela-Mejías, A., & Alfaro-Mora, R. (2018). Revisión sobre aspectos farmacológicos a considerar para el uso de antibióticos en la camaronicultura. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 29(1), 1-14. <https://doi.org/10.15381/rivep.v29i1.14186>
- Vera, C. E., & Mendoza, J. J. (2020). *Evaluación de parámetros físico-químicos de aguas de pozo para cultivo intensivo de camarón blanco del Pacífico *Penaeus vannamei* con baja tasa de recambio* [Tesis de Ingeniero Acuícola, Escuela Politécnica del Litoral]. <http://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/51448>
- Vieira, R. H. S. F., Lima, E. A., Sousa, D. B. R., Reis, E. F., Costa, R. G., & Rodrigues, D. P. (2004). *Vibrio* spp. and *Salmonella* spp., presence and susceptibility in crabs *Ucides cordatus*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 46(4), 179-182. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652004000400001>
- Waglechner, N., Culp, E. J., & Wright, G. D. (2021). Ancient antibiotics, ancient resistance. *EcoSal Plus*, 9(2), 1-17. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0027-2020>
- Wieser, M., & Busse, H. J. (2000). Rapid identification of *Staphylococcus epidermidis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(3), 1087-1093. <https://doi.org/10.1099/00207713-50-3-1087>
- Wilson, C. J., Brain, R. A., Sanderson, H., Johnson, D. J., Bestari, K. T., Sibley, P. K., & Solomon, K. R. (2004). Structural and functional responses of plankton

- to a mixture of four tetracyclines in aquatic microcosms. *Environmental Science & Technology*, 38(23), 6430-6439. <https://doi.org/10.1021/es049766f>
- Wiśniewski, P., Zakrzewski, A. J., Zadernowska, A., & Chajęcka-Wierzchowska, W. (2022). Antimicrobial resistance and virulence characterization of *Listeria monocytogenes* strains Isolated from food and food processing Environments. *Pathogens*, 11(10), 1099. <https://doi.org/10.3390/pathogens11101099>
- Xie, X., Zhou, Q., He, Z., & Bao, Y. (2010). Physiological and potential genetic toxicity of chlortetracycline as an emerging pollutant in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(4), 922-928. <https://doi.org/10.1002/etc.79>
- Xu, L., Zhang, H., Xiong, P., Zhu, Q., Liao, C., & Jiang, G. (2021). Occurrence, fate, and risk assessment of typical tetracycline antibiotics in the aquatic environment: A review. *Science of The Total Environment*, 753, 141975. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141975>
- Xu, T., Zhao, W., Guo, X., Zhang, H., Hu, S., Huang, Z., & Yin, D. (2020). Characteristics of antibiotics and antibiotic resistance genes in Qingcaosha Reservoir in Yangtze River Delta, China. *Environmental Sciences Europe*, 32(1), 82. <https://doi.org/10.1186/s12302-020-00357-y>
- Yuan, J., Ni, M., Liu, M., Zheng, Y., & Gu, Z. (2019). Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in a typical estuary aquaculture region of Hangzhou Bay, China. *Marine Pollution Bulletin*, 138, 376-384. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.11.037>

- Zhang, Q., Cheng, J., & Xin, Q. (2015). Effects of tetracycline on developmental toxicity and molecular responses in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Ecotoxicology*, 24(4), 707-719. <https://doi.org/10.1007/s10646-015-1417-9>
- Zhao, Y., Yang, Q. E., Zhou, X., Wang, F.-H., Muurinen, J., Virta, M. P., Brandt, K. K., & Zhu, Y.-G. (2020). Antibiotic resistome in the livestock and aquaculture industries: Status and solutions. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 1-38. <https://doi.org/10.1080/10643389.2020.1777815>
- Zheng, D., Yin, G., Liu, M., Chen, C., Jiang, Y., Hou, L., & Zheng, Y. (2021). A systematic review of antibiotics and antibiotic resistance genes in estuarine and coastal environments. *Science of the Total Environment*, 777, 146009. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146009>
- Zhu, X.-D., Wang, Y.-J., Sun, R.-J., & Zhou, D.-M. (2013). Photocatalytic degradation of tetracycline in aqueous solution by nanosized TiO₂. *Chemosphere*, 92(8), 925-932. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.02.066>
- Zhuang, M., Achmon, Y., Cao, Y., Liang, X., Chen, L., Wang, H., Siame, B. A., & Leung, K. Y. (2021). Distribution of antibiotic resistance genes in the environment. *Environmental Pollution*, 285, 117402. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117402>

ANEXOS

Anexo 1. Ubicación de zonas de muestreo.

Tabla 33. Ubicación y coordenadas UTM de puntos de muestreo.

Punto de muestreo	Ubicación	Coordenadas en UTM (Datum WGS84, Zona 17M)	
		Longitud	Latitud
1	Desembocadura del río Tumbes	-560526,6	-9612057,0
2	Puerto Pizarro	-569474,0	-9613592,8
3	El Bendito	-576300,5	-9622431,4

Anexo 2. Formulario de registro de datos de langostinos silvestres.

FORMULARIO 1

RECOLECCIÓN DE DATOS DE LANGOSTINOS

N° Registro:

Nombre del responsable: _____

Lugar de recolección: _____

Fecha: ___/___/___ Hora: _____

ESPECIE:

- | | | | |
|---|--------------------------|--|--------------------------|
| 1) <i>Litopenaeus vannamei</i> | <input type="checkbox"/> | 2) <i>Litopenaeus stylirostris</i> | <input type="checkbox"/> |
| 3) <i>Litopenaeus occidentalis</i> | <input type="checkbox"/> | 4) <i>Farfantepenaeus californiensis</i> | <input type="checkbox"/> |
| 5) <i>Farfantepenaeus brevirrostris</i> | <input type="checkbox"/> | 6) No se puede determinar | <input type="checkbox"/> |

SEXO: Macho Hembra Indeterminado

MEDIDAS:

LT (cm): _____ Peso (g): _____

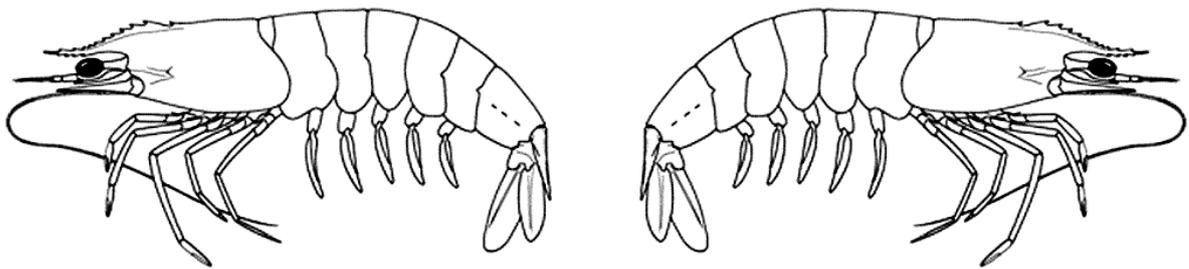
OBSERVACIONES EXTERNAS:

- 1) Color del animal: _____
- 2) Expansión de cromatóforos: Si () No ()
- 3) Deformidades en rostro, abdomen o apéndices: Si () No ()
Indique: _____
- 4) Flexión del músculo abdominal (calambre): Si () No ()
- 5) Color de las branquias: blancas () marrón () negras () Amarillas ()
Otro () Indique: _____
- 6) Color de los apéndices (periópodos, pleópodos y urópodos) : normal () rojo ()
Negro () Otro () Indique: _____
- 7) Color de las antenas: normal () rojo ()
Otro () Indique: _____

- 8) Transparencia de los músculos del abdomen y del cefalotórax:
 Transparente () Blanquecino () Otro () Indique: _____
- 9) Repleción Intestinal (porcentaje del Intestino que se encuentra lleno): _____
- 10) Textura del exoesqueleto: duro () blando()
- 11) Manchas, lesiones, melanosis, astillas clavadas:
 Indique: _____

UBICACIÓN DE LESIONES/MELANIZACIÓN

En la figura, señalar las zonas de manchas (M), lesiones (L), melanosis (Me), astillas clavadas (A).



OBSERVACIONES ADICIONALES:

Anexo 3. Formulario de registro de datos de *Ucides occidentalis*.

FORMULARIO 2

RECOLECCIÓN DE DATOS DE CANGREJOS DEL MANGLAR

N° Registro:

Nombre del responsable: _____

Lugar de recolección: _____

Fecha: ___/___/___ Hora: _____

SEXO: Macho Hembra

MEDIDAS:

Longitud cefalotorácica (cm): _____

Peso (g): _____

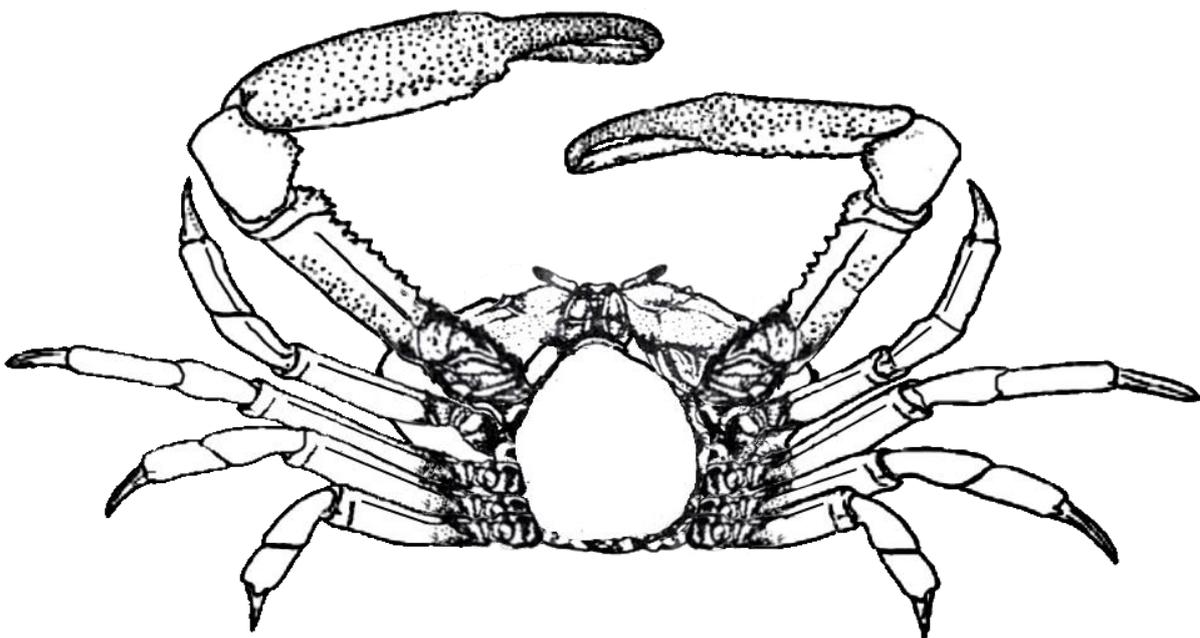
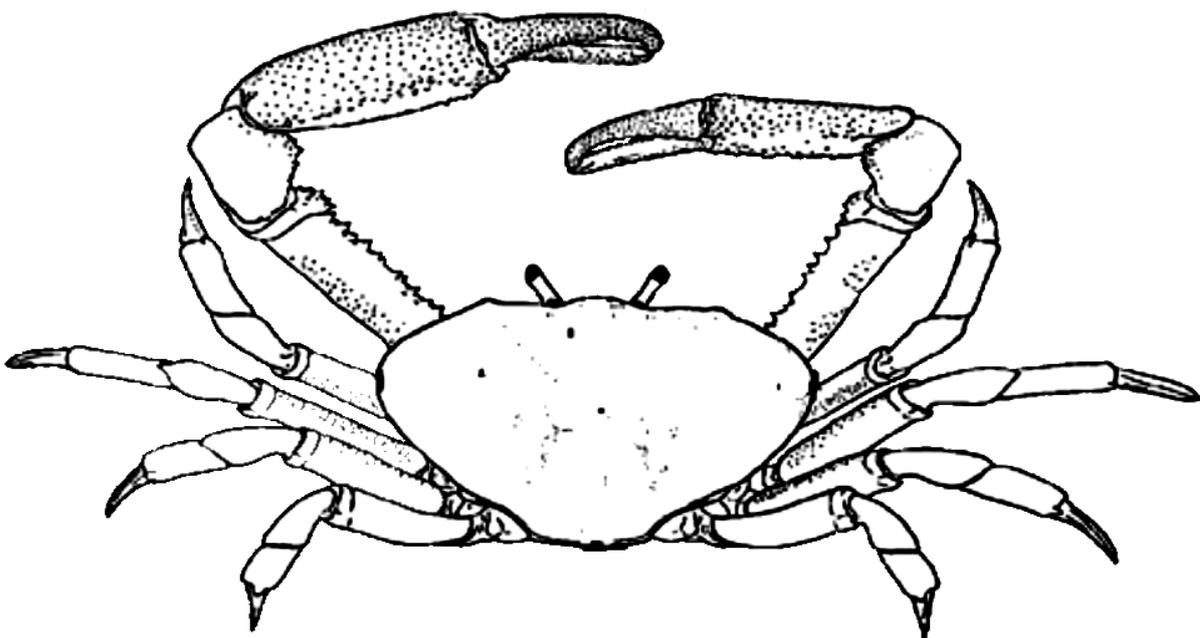
OBSERVACIONES EXTERNAS:

- 1) Textura del exoesqueleto: duro () blando()
- 2) Manchas, lesiones, melanosis, astillas clavadas:

Indique: _____

UBICACIÓN DE LESIONES/MELANIZACIÓN

En la figura, señalar las zonas de manchas (M), lesiones (L), melanosis (Me), astillas clavadas (A).



OBSERVACIONES ADICIONALES:

Anexo 4. Procedimiento para la determinación de residuos antibióticos.

A) Preparación de la solución:

Se preparó solución de ácido tricloroacético al 1%; disolviendo 1 g de ácido tricloroacético en polvo en 100 ml de agua desionizada; posteriormente la solución de la muestra concentrada 20X con agua desionizada (20X Con agua desionizada (V): agua desionizada (V)=1:19); finalmente se diluyó el tampón de lavado concentrado 20X con agua desionizada (Tampón de lavado concentrado 20X (V): agua desionizada (V)=1:19).

B) Preparación de las muestras:

En esta etapa se homogenizó la muestra en un homogenizador, posteriormente en un tubo de 50 ml de centrifuga se pesó de $1 \pm 0,05$ g de la muestra homogenizada; se agregó 4 ml de solución de ácido tricloroacético al 1% y se procedió a centrifugar a 4000 rpm/min durante 5 min a temperatura ambiente; luego de este paso se tomó 40 μ l del sobrenadante de la parte superior y se agregó 1560 μ l de la solución diluida de la muestra concentrada procediéndose a agitar en un vórtex por 30 s; finalmente se tomó 20 μ l para el respectivo análisis.

C) Procedimiento del ensayo cuantitativo:

Este procedimiento consistió en seis pasos:

1. Se numeró la muestra y el estándar en orden de los pocillos y se anotó en una bitácora los códigos y el orden las muestras.
2. Se agregó 20 μ l de la solución estándar o muestra por pocillo, luego se agregó 50 μ l de conjugado de HRP a cada pocillo; después de ello se agregó 50 μ l de la solución de trabajo de anticuerpos, posteriormente se cubrió la placa con el sellador, luego se osciló durante 10 s para mezclar bien y suavemente, finalmente se incubó a 25 °C por 30 min a luz de sombra.
3. En esta etapa se destapó el sellador con cuidado y se retiró el líquido de cada pocillo, se agregó 260 μ l de tampón de lavado (solución 3); este procedimiento se repitió cuatro veces, posteriormente se invirtió la placa y se golpeó suavemente contra el papel absorbente.

4. Se procedió a agregar 50 μ l del reactivo de sustrato A en cada pocillo y luego se agregó 50 μ l del reactivo del sustrato B. Se dejó oscilar durante 10 s para que se mezclaran muy bien. Finalmente se incubó a 25 °C por 15 min en oscuridad.
5. Se agregó 50 μ l de la solución de detención a cada pocillo, se agitó suavemente durante 10 s para que se mezclara por completo.
6. Finalmente se procedió a la medición de OD (densidad óptica) de cada pocillo o muestra a una longitud de onda de 450 nm a 630 nm.

Anexo 5. Recolección de muestras, toma de parámetros físico químico y obtención de tejidos.



Figura 4. Proceso de recolección de cangrejos, langostinos silvestres y muestras de agua en el ecosistema manglar. a) Captura de langostinos silvestres. b) Colecta de *Ucides occidentalis*. c) Medición de salinidad y d) Determinación de parámetros químicos del agua y sustrato en laboratorio.

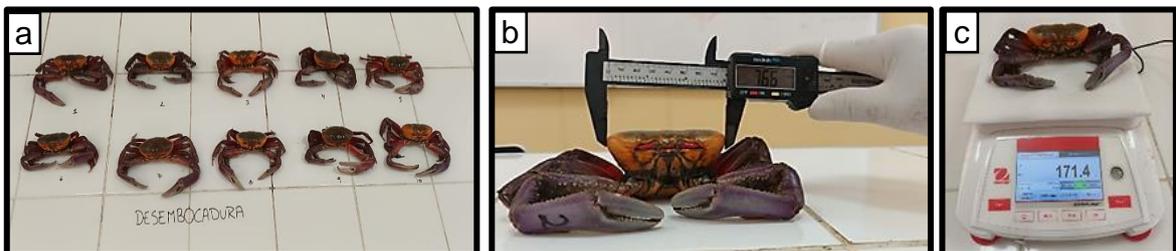


Figura 5. Proceso de toma de parámetros biométricos en *Ucides occidentalis*. a) ejemplares ordenados para la toma de medidas, b) medición del ancho cefalotorácico y c) pesado del ejemplar.



Figura 6. Toma de muestras de tejidos en cangrejos del manglar y langostinos. a) Extracción de hemolinfa en cangrejos b) Vista del hepatopáncreas en cangrejo y c) Extracción de hemolinfa en langostinos silvestres.

Anexo 6. Microbiología del trabajo de investigación.

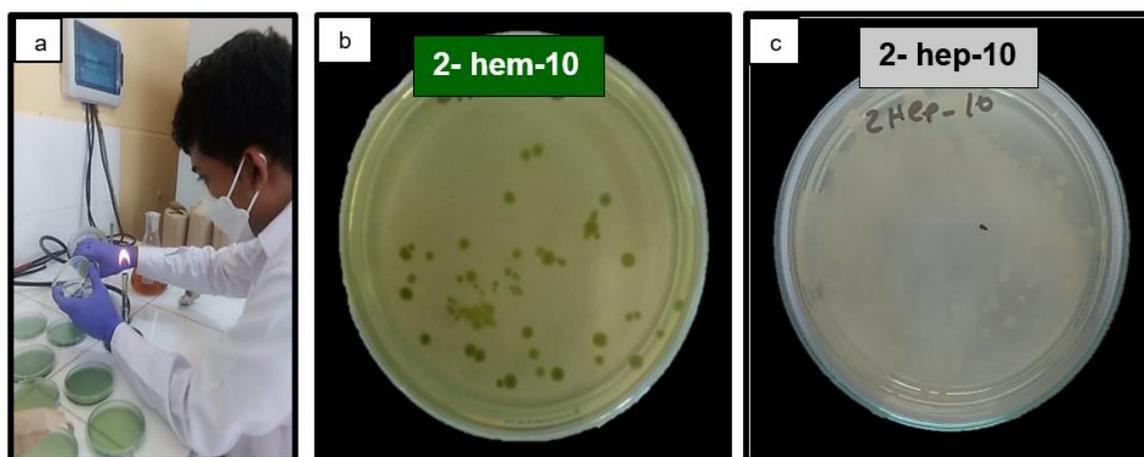


Figura 7. Siembra de cepas en medios TCBS y TSA. a) Siembra de muestras de hemolinfa y tejidos sólidos, b) colonias crecidas en medio TCBS y c) colonias crecidas en medio TSA.

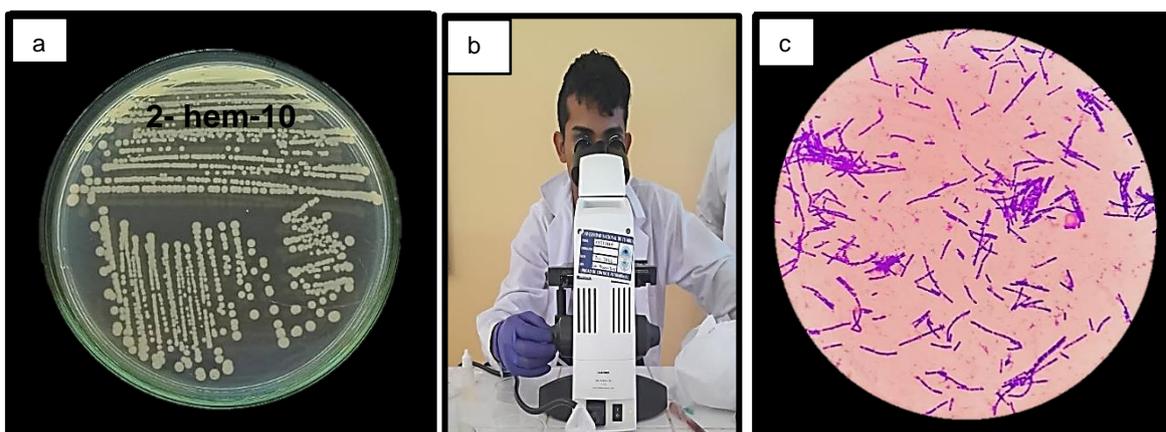


Figura 8. Identificación de cepas utilizando coloración Gram. a) Colonias purificadas, b) observación de UFC en microscopio y c) vista de bacilos Gram positivos.

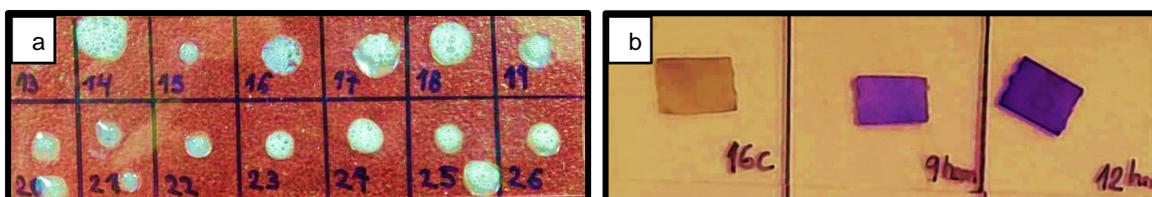


Figura 9. Pruebas bioquímicas de catalasa y oxidasa. a) Prueba de catalasa y b) Prueba de oxidasa.

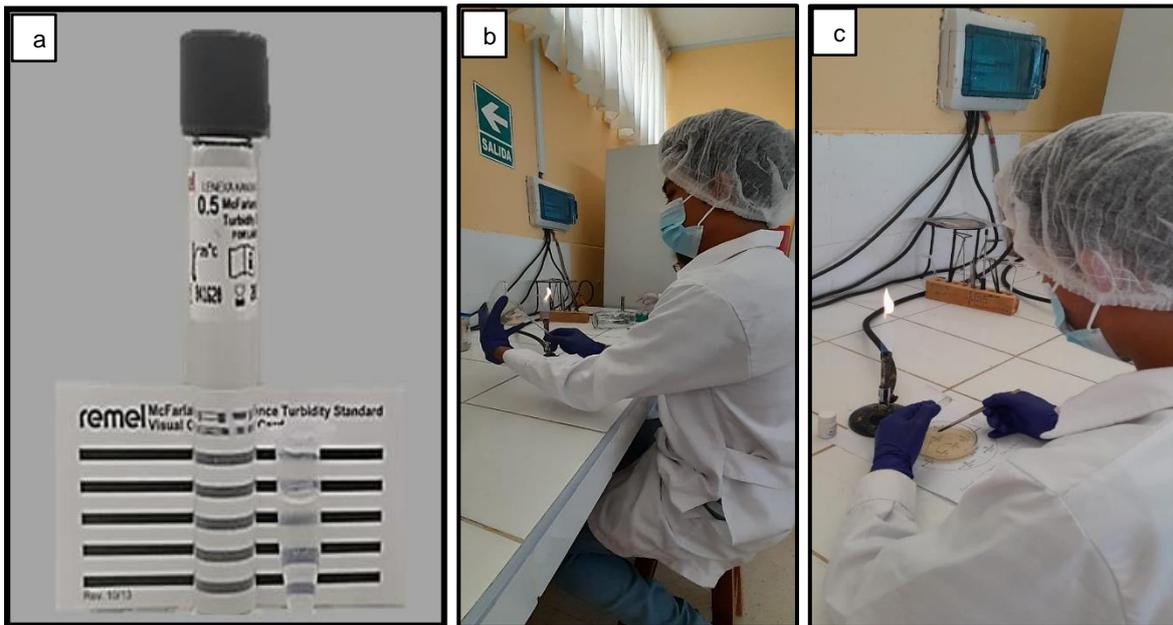


Figura 10. Siembra de cepas en medio Müller Hinton y disposición de discos de antibióticos. a) Concentración de Mac Farland a cepas bacterianas, b) Siembra de cepas en medio Mueller Hinton y c) Colocación de discos de antibióticos.

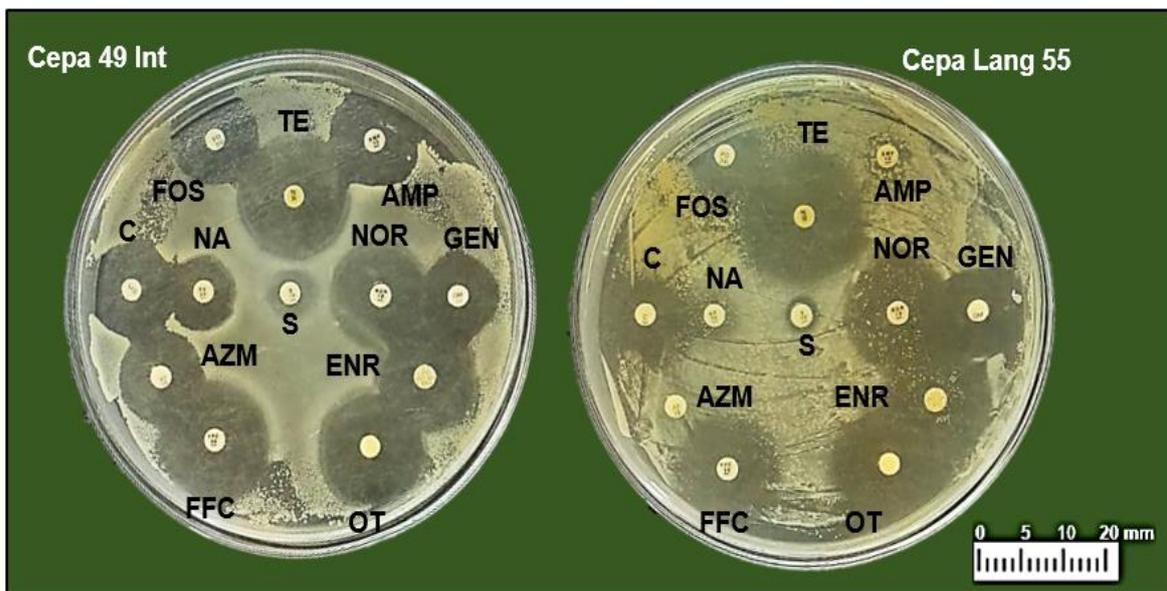


Figura 11. Antibiogramas realizados en cepa de cangrejo (49 int) y langostino silvestre (Lang 55).

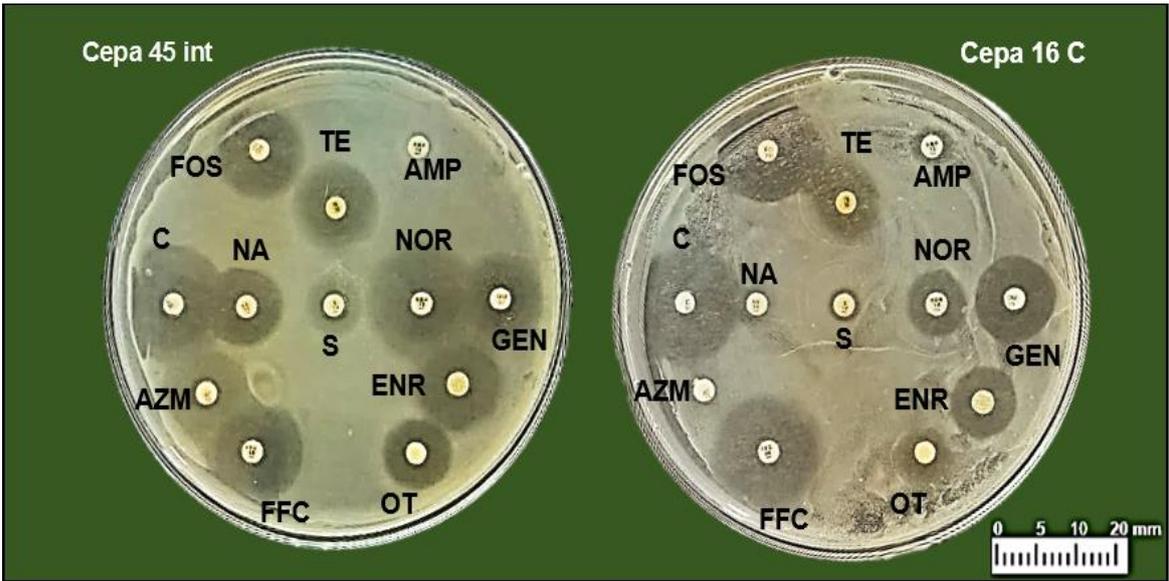


Figura 12. Antibiogramas realizados en cepas de cangrejo del manglar (*Ucides occidentalis*).

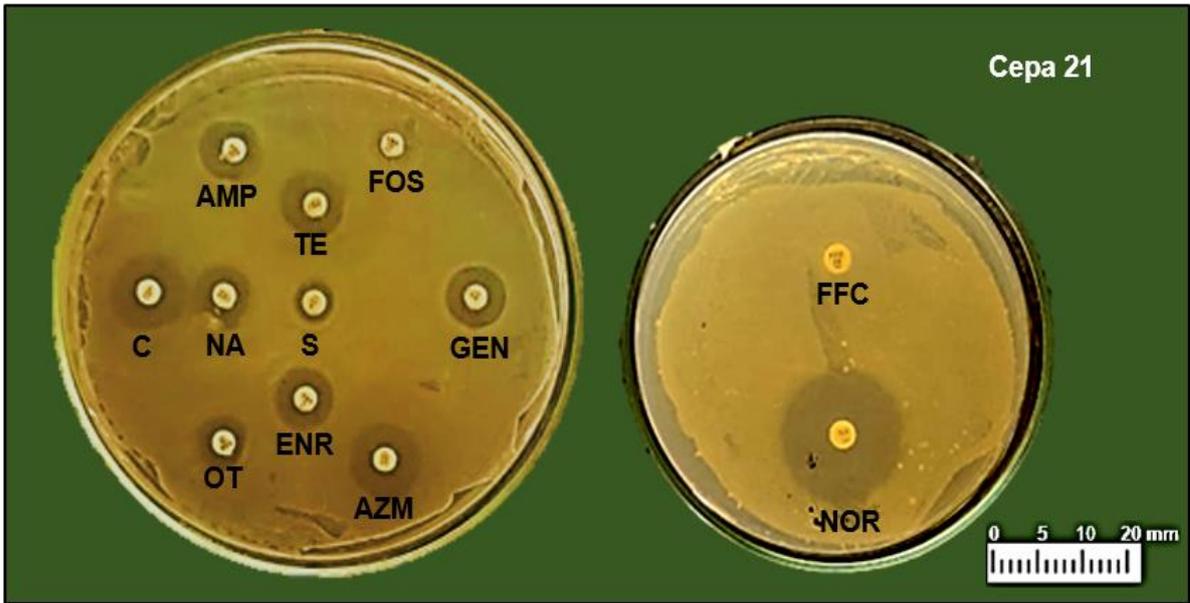


Figura 13. Antibiogramas realizados en cepas de cangrejo del manglar (*Ucides occidentalis*).

Anexo 7. Fase molecular del trabajo de investigación.



Figura 14. Extracción de ADN. a) Muestras de tejido de langostino y *Ucides occidentalis* y kit Presto™ Soil DNA Extraction y b) Centrifugado de *pellets* de cepas bacterianas.

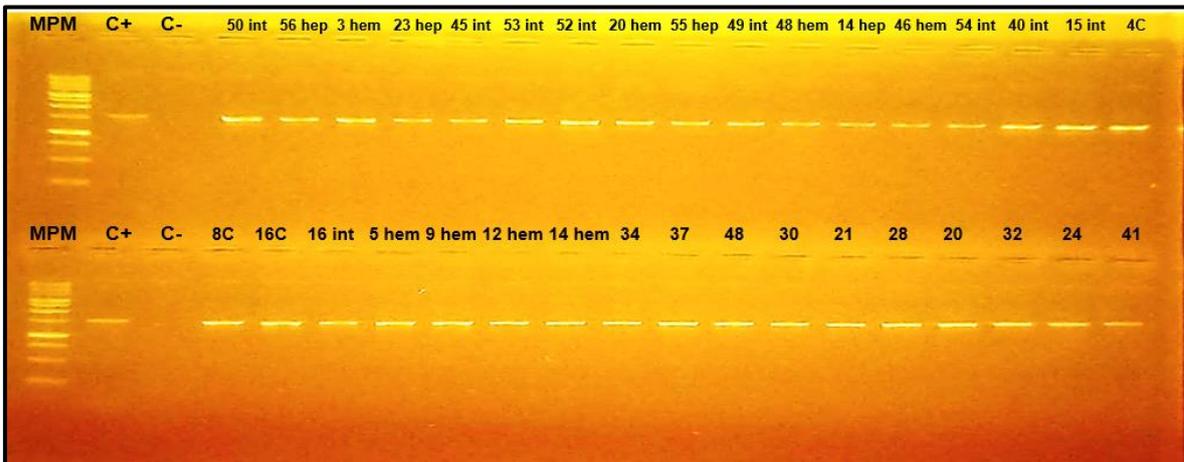


Figura 15. Gel de electroforesis con amplicones de fragmentos del gen 16S ARNr de cepas bacterianas aisladas en *U. occidentalis*.

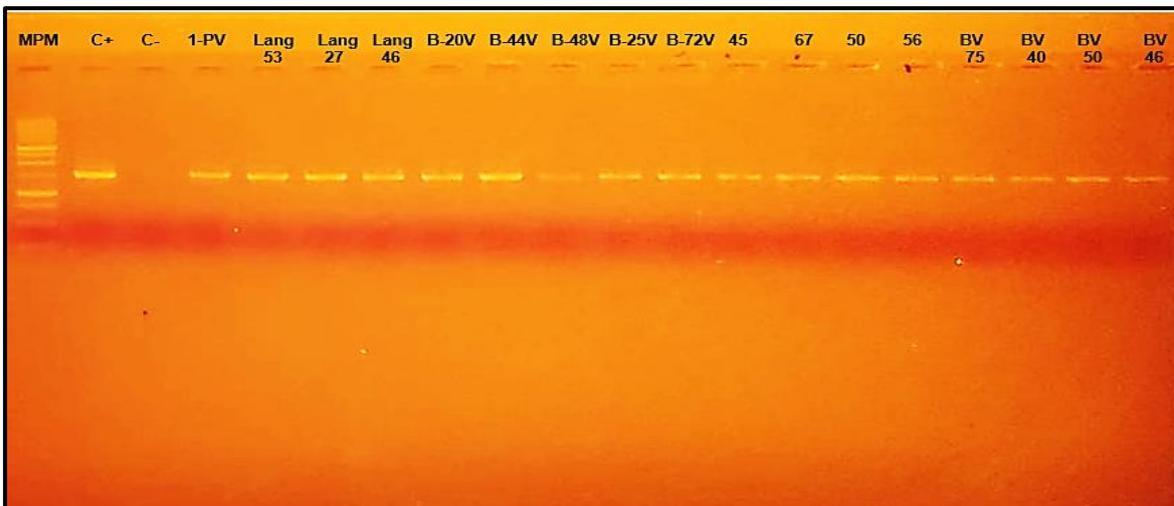


Figura 16. Gel de electroforesis con amplicones de fragmentos del gen 16S ARNr de cepas bacterianas aisladas en *L. vannamei*.

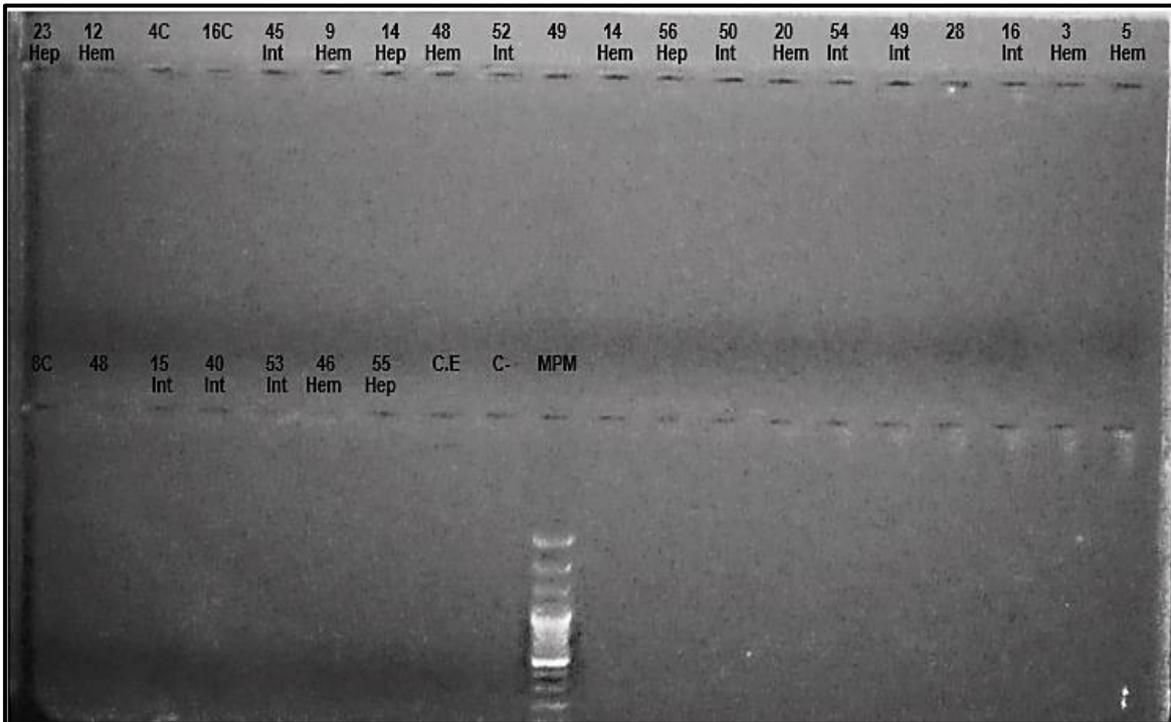


Figura 17. Gel de migración de amplicones del gen *tetA* en cepas bacterianas de *U. occidentalis*. No se observan bandas fluorescentes, salvo las del marcador de peso molecular (MPM).

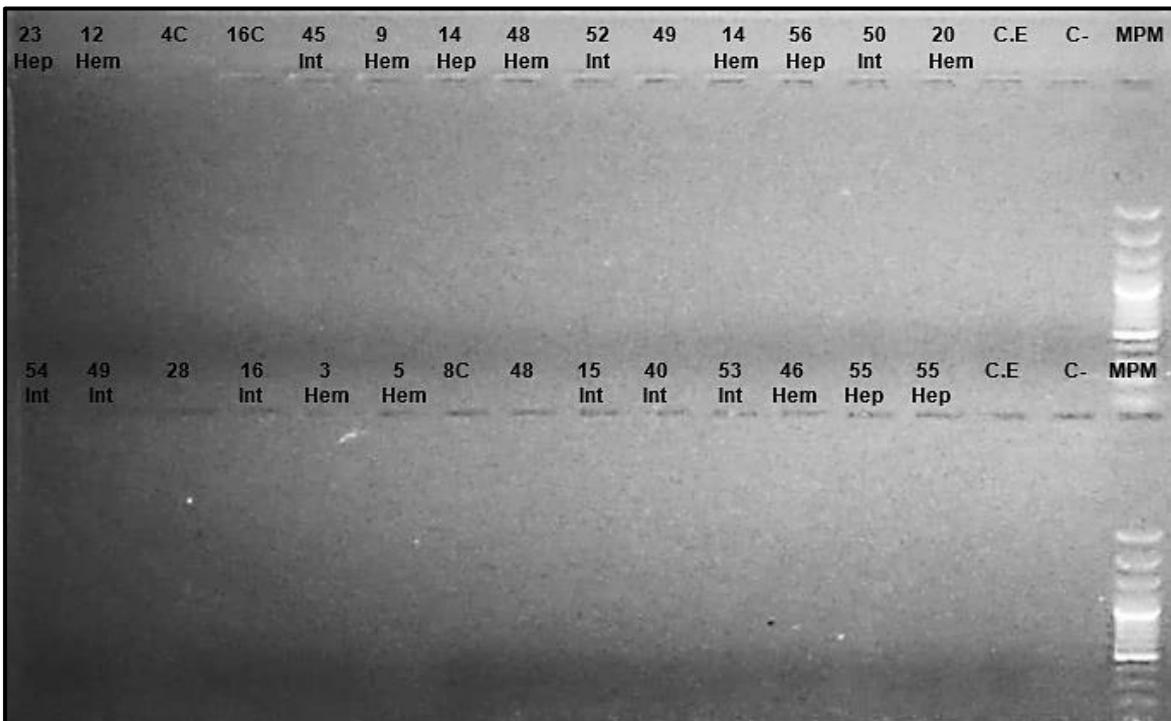


Figura 18. Gel de migración de amplicones del gen *tetB* en cepas bacterianas de *U. occidentalis*. No se observan bandas fluorescentes, salvo las del marcador de peso molecular (MPM).

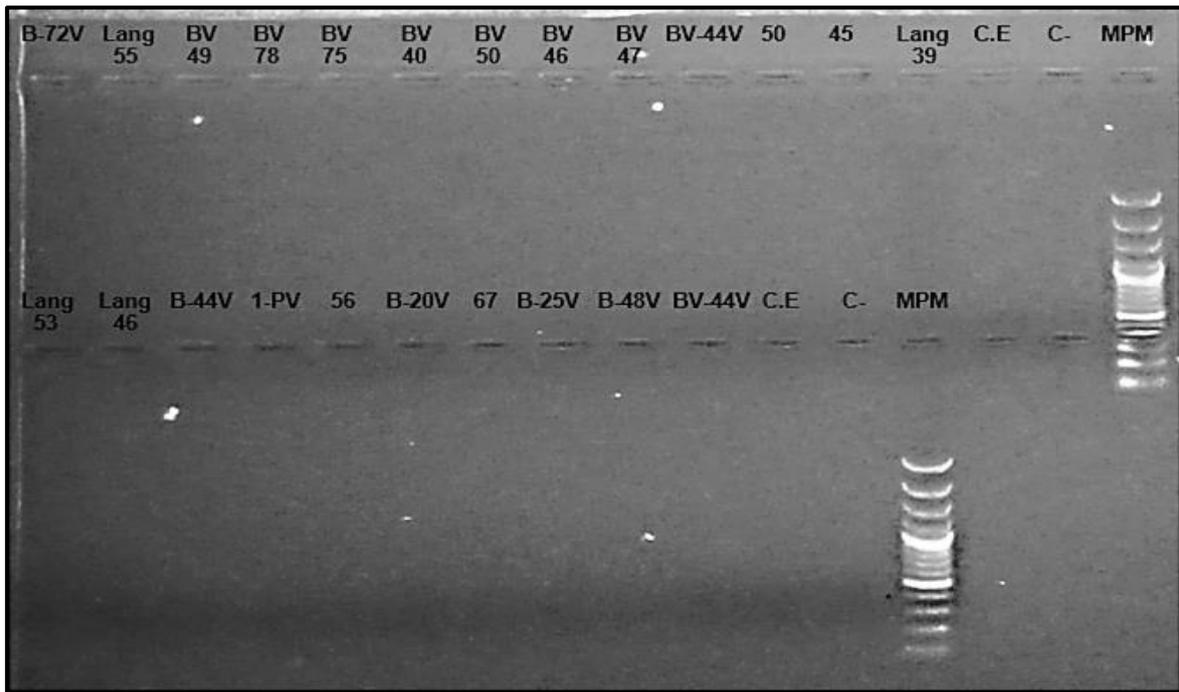


Figura 19. Gel de migración de amplicones del gen *tetA* en cepas bacterianas de *L. vannamei*. No se observan bandas fluorescentes, salvo las del marcador de peso molecular (MPM).

Anexo 8. Residuos antibióticos en la parte comestible de cangrejos y langostinos silvestres.

Tabla 34. Residuos antibióticos en tejidos de cangrejos del manglar y langostinos silvestres.

Muestra	Zona	Concentración de antibióticos (ng/g)	Medida (OD) (IU)	Mean OD (ID)	OD 450 nm	Desviación estándar OD	Coefficiente de variación (OD)
Parte comestible de langostino	SNLMT*	0,0044	2,2067	2,2067	2,1300	0,0767	3,4793
	El Bendito	0,0700	2,0284	2,0284	2,1210	0,0926	4,5656
	Puerto Pizarro	0,0482	2,0569	2,0569	2,1368	0,0799	3,8877
	Desembocadura del río Tumbes	0,0044	2,1876	2,1876	2,1644	0,0232	1,0615
Parte comestible de cangrejo del manglar	SNLMT	0,0044	2,2781	2,2781	2,3026	0,0245	1,0731
	El Bendito	0,0044	2,3390	2,3390	2,3848	0,0458	1,9564
	Puerto Pizarro	0,0044	2,3020	2,3020	2,2292	0,0728	3,1629
	Desembocadura del río Tumbes	0,0044	2,2633	2,2633	2,3480	0,0847	3,7443
Tejidos del cefalotórax de langostino (no incluye exoesqueleto)	SNLMT	0,0044	2,2719	2,2719	2,2580	0,0139	0,6100
	El Bendito	0,0044	2,2014	2,2014	2,1553	0,0461	2,0900
	Puerto Pizarro	0,0044	2,3108	2,3108	2,3084	0,0024	0,1047
	Desembocadura del río Tumbes	0,0044	2,2663	2,2663	2,2331	0,0332	1,4656