

**UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y**

**ARTES DE CHIAPAS**

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

SEDE TONALÁ

**T E S I S**

MICROBIOTA BACTERIANA CLOACAL Y  
BUCAL DE *Lepidochelys olivacea*  
(Eschscholtz, 1829) EN EL SANTUARIO  
PLAYA PUERTO ARISTA, CHIAPAS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

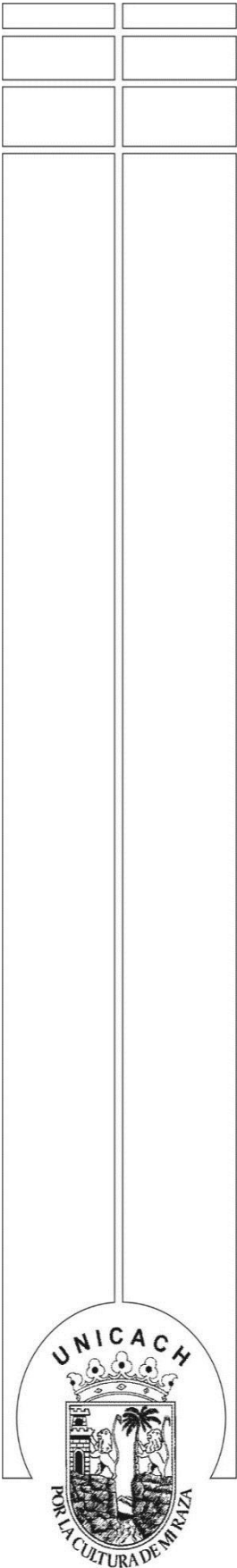
LICENCIADA EN BIOLOGÍA MARINA Y  
MANEJO INTEGRAL DE CUENCAS

PRESENTA

**ELSY GABRIELA LORENZANA MANUEL**

TONALA, CHIAPAS

DICIEMBRE DE 2023



**UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y**

**ARTES DE CHIAPAS**

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

SEDE TONALÁ

**T E S I S**

MICROBIOTA BACTERIANA CLOACAL  
Y BUCAL DE *Lepidochelys olivacea*  
(Eschscholtz, 1829) EN EL SANTUARIO  
PLAYA PUERTO ARISTA, CHIAPAS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
LICENCIADA EN BIOLOGÍA MARINA Y  
MANEJO INTEGRAL DE CUENCAS

PRESENTA

**ELSY GABRIELA LORENZANA MANUEL**

DIRECTOR

**DR. EMILIO ISMAEL ROMERO BERNY**  
CENTRO DE INVESTIGACIONES COSTERAS, INSTITUTO DE CIENCIAS  
BIOLÓGICAS. UNICACH

ASESOR

**DR. JAVIER GUTIÉRREZ JIMÉNEZ**  
INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS. UNICACH

TONALA, CHIAPAS

DICIEMBRE DE 2023





## **DEDICATORIA**

### **A mis padres:**

Con todo mi amor y admiración por ser las personas que hicieron todo en la vida para que yo pudiera lograr mis sueños, por su paciencia y motivación cuando sentía que el camino era imposible, a ustedes Elsa Manuel Luján y Martín Lorenzana Vázquez; por siempre mi corazón y agradecimiento.

### **A mi hermana y sobrinas:**

Sé que siempre estarás ahí para darme algún consejo, agradezco tu apoyo incondicional y por compartir momentos de felicidad y de tristeza, y por traer al mundo a lo más hermoso que tengo en la vida; mis sobrinas quienes son mi motivación en la vida. Ustedes han sido el pilar en mi vida, los amo con el alma.

### **A mi novio:**

Tu paciencia y cariño han sido el motor que me ha impulsado a superar cada obstáculo en éste camino, gracias por estar a mi lado en cada paso, por siempre motivarme, por ser mi apoyo emocional, y compartir noches de desvelo conmigo. Éste proyecto no solo es un logro personal, sino también nuestro logro compartido.

### **A mis amigas:**

Quienes me apoyaron cuando más lo necesite, por darme ese cariño y apoyo incondicional, por estar conmigo en todo momento, acompañándome a cumplir todos mis sueños y metas, siempre estaré agradecida con ustedes.

### **A Dios:**

Por permitirme llegar a éste momento tan importante de mi formación profesional, por darme salud, sabiduría y fortaleza para no desistir.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Emilio Ismael Romero Berny por darme la oportunidad y confianza de participar en su proyecto de investigación y dirigir ésta tesis, por dedicar el tiempo y paciencia, por su amistad y consejos en mi etapa universitaria. Agradezco su optimismo, su motivación y apoyo tanto financiero como presencial en los momentos de elaboración de éste proyecto. A todos los profesores del Centro de Investigaciones costeras, por ser parte importante de mi formación profesional.

Al Dr. Javier Gutiérrez Jiménez por aceptar ser asesor de ésta tesis, por el recibimiento cálido y aceptación en el Laboratorio de Biología Molecular y Genética, Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Agradezco su amistad, sus consejos enriquecedores, por tenerme paciencia y enseñarme sobre microbiología. Y a las personas tan lindas que conocí en el laboratorio, Fátima, Tania, Nashelly y Ania.

Mi sincero agradecimiento al Campamento Tortuguero de Playa de Puerto Arista, de la Dirección de Áreas Naturales y Vida Silvestre, de la Secretaria de Medio Ambiente e Historia Natural (SEMAHN) especialmente a la Lic. Mireya Domínguez Aquino y a todo el personal técnico: Esdras, Filiberto, Darinel, Barush y Amadeo.

A mis sinodales, al Dr. Jesús Manuel López Vila y al Mtro. Víctor Manuel Guillen Rodríguez, por tomarse el tiempo para revisar el trabajo realizado, así como sus correcciones y sugerencias.

A Daniel Alexander Romero Velasco, por su apoyo incondicional, por acompañarme en todos los muestreos, gracias por estar a mi lado en ésta etapa tan importante, por no dejarme sola y por estar motivándome todos los días. A Mélida Velasco Morales por sus consejos, su apoyo y motivación, y su cariño hacia mí.

A mis amistades que estuvieron en ésta etapa de mi vida, motivándome y dándome su apoyo incondicional: Leonardo Palacios, Jovana Pérez, Mayetzi Ramos, Yamilet Lorenzana y Sheridan Hernández, Luis Fernando siempre mantendré esos momentos vividos y el apoyo hacia mi persona.

# Índice General

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS .....	iii
I. RESUMEN.....	vii
II. ABSTRACT.....	viii
III. INTRODUCCIÓN.....	1
IV. MARCO TEORICO .....	3
4.1 Descripción de <i>Lepidochelys olivacea</i> .....	3
4.2 Amenazas para la supervivencia de <i>L. olivacea</i> . .....	6
4.3 Microbiota bacteriana en tortugas marinas. ....	8
4.4 Taxones bacterianos identificados en <i>L. olivacea</i> .....	9
4.4.1 Familia <i>Enterobacteriaceae</i> .....	9
4.4.2 Familia <i>Pseudomonadaceae</i> .....	10
4.4.3 Familia <i>Staphylococcaceae</i> .....	11
4.4.4 Familia <i>Streptococcaceae</i> .....	11
4.4.5 Familia <i>Vibrionaceae</i> .....	12
4.5 Técnicas de identificación bioquímica de bacterias.....	12
4.6 Técnica de Tinción de Gram.....	14
V. ANTECEDENTES.....	15
VI. OBJETIVOS E HIPÓTESIS .....	17
6.1 OBJETIVO GENERAL.....	17
6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
6.3 HIPÓTESIS.....	17
VII. ZONA DE ESTUDIO .....	18
VIII.MÉTODO .....	24
IX. RESULTADOS .....	31
X. DISCUSIÓN.....	36
XI. CONCLUSIONES .....	41
XII. RECOMENDACIONES.....	42
XIII.REFERENCIAS. ....	43
ANEXOS .....	50

## Índice de cuadros

Cuadro 1. Lista taxonómica de la microbiota bacteriana de <i>Lepidochelys olivacea</i> en Playa Puerto Arista, Chiapas. Celdas sombreadas en gris indican distribución en determinada cavidad. ....	31
Cuadro 2. Valores medios (Desv. Estándar), mínimos y máximos del Largo Curvo del Caparazón (LCC) y Ancho Curvo del Caparazón (ACC) de hembras anidantes de <i>L. olivacea</i> . N: número de hembras muestreadas.....	35
Cuadro 3. Valores de los coeficientes de correlación de Pearson (r) entre la riqueza taxonómica bacteriana con la información morfométrica del Largo Curvo del Caparazón (LCC) y Ancho Curvo del Caparazón (ACC) de hembras anidantes de <i>L. olivacea</i> . Valor de $P > 0.05$ es significativo. ....	35

## Índice de Figuras

Figura 1. Hembra anidante de <i>Lepidochelys olivacea</i> en el Santuario Playa de Puerto Arista, Chiapas, México. Autor: Elsy Gabriela Lorenzana Manuel.....	3
Figura 2. a) Esquema de una cría de <i>Lepidochelys olivacea</i> . b) Ilustración de ejemplar en etapa adulta de <i>Lepidochelys olivacea</i> . Fuente: Eckert et al. (2000)...	4
Figura 3. Mapa de distribución de <i>L. olivacea</i> a nivel mundial. Modificado de: <a href="http://www.iucnredlist.org">www.iucnredlist.org</a> .....	5
Figura 4. Mapa de distribución de las especies de tortugas marinas en México. Fuente: Portal ambiental.mx (2022). .....	6
Figura 5. Localización del área de estudio Santuario Playa de Puerto Arista, Chiapas, México. Fuente: CONANP, 2014 .....	19
Figura 6. Obtención de muestras bacterianas en hembras anidantes de la tortuga golfina ( <i>L. olivacea</i> ). A) Región cefálica y área bucal de la tortuga golfina, B) Toma de muestra en cavidad bucal, C) Región de la cloaca de hembra anidante de tortuga golfina, D) Toma de muestra en cavidad cloacal con hisopo estéril.....	25
Figura 7. Toma de medidas morfométricas de LCC Y ACC en hembra anidante.	26
Figura 8. Proceso para la identificación de las muestras A) Siembra de bacterias aeróbicas en Agar MacConkey, B) técnica de tinción de Gram, C) prueba de catalasa, D) prueba de oxidasa.....	27
Figura 9. Uso del sistema miniaturizado API20E (BIOMÉRIEUX) para identificación de bacterias Gramnegativas.....	29
Figura 10. Frecuencia y porcentaje de taxones Gramnegativos (A) y Grampositivos (B) encontrados por cavidades de <i>L. olivacea</i> .....	32
Figura 11. Proporción (%) de generos encontrados en cavidad cloacal (A) y en cavidad bucal (B) de <i>L. olivacea</i> .....	33
Figura 12. Frecuencia relativa de generos bacterianos obtenidos por mes de muestreo.....	34



## I. RESUMEN

Las playas de Chiapas, en el Pacífico Mexicano, son un importante sitio de anidación de la tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*). Al tratarse de reptiles marinos migratorios, de crecimiento lento y madurez sexual tardía, son difíciles de estudiar en el medio natural, por lo que el proceso de anidación es importante para obtener información biológica. Los estudios microbiológicos en estas especies, permiten comprender los riesgos potenciales de la zoonosis bacteriana, derivada del manejo de tortugas y el consumo de huevos. En este trabajo se obtuvieron datos morfométricos y muestras cloacales y bucales de 23 hembras anidantes de *L. olivacea*, de agosto-diciembre de 2021, en el Santuario Playa de Puerto Arista, Chiapas, México. Se identificaron mediante pruebas bioquímicas, un total de 18 taxones bacterianos, de los cuales cinco son géneros, lográndose identificar hasta 12 especies. De manera significativa, una mayor cantidad de taxones se aislaron en la cavidad bucal (N=18), de los cuales cinco solo se identificaron a género; en la cloaca se recuperaron seis taxones; dos se identificaron a género y cuatro a nivel de especie. El género más frecuente en ambas cavidades fue *Enterobacter*, además de *Citrobacter*, *Streptococcus* y *Staphylococcus*. De las bacterias identificadas en este estudio, las especies potencialmente patógenas para el ser humano fueron *P. aeruginosa*, *K. ozaenae* y *V. alginolyticus*. Este tipo de análisis son esenciales para determinar el potencial infeccioso de las bacterias para las especies de tortuga marina, así como para el ser humano. Al ser especies amenazadas, es necesario contar con una línea base que permita la atención de animales inmunodeprimidos y enfermos. Así mismo, permiten evaluar el potencial zoonótico en las actividades de manejo de las especies de tortugas, lo cual es de especial interés para el personal de los campamentos instalados en las playas del país.

**Palabras claves:** Pacífico mexicano, cloaca, zoonosis, Enterobacteriaceae, desove.

## II. ABSTRACT

The beaches of Chiapas, at the Mexican Pacific, are an important nesting site for the *Lepidochelys olivacea* species. As they are migratory marine reptiles, they are difficult to study in the natural environment, so the nesting process is important to obtain biological information. Microbiological studies in these species allow us to understand the potential risks of bacterial zoonosis, derived from the handling of turtles and the consumption of eggs. In this work, morphometric data and cloacal and oral samples were obtained from 23 nesting females of *L. olivacea*, from August-December 2021, at the Puerto Arista beach, Chiapas, Mexico. A total of 18 bacterial taxa were identified through biochemical tests, of which five are genera, and up to 12 species were identified. A significant higher number of taxa were isolated from oral cavity (N=18), of which five were only identified to genus. Six taxa were isolated from the cloaca, two of them were identified to genus and four to species level. The most frequent genus in both cavities was *Enterobacter*, in addition to *Citrobacter*, *Streptococcus* and *Staphylococcus*. Also, the potentially pathogenic species for humans *P. aeruginosa*, *K. ozaenae* and *V. alginolyticus* were identified. These types of analyzes are essential to determine the infectious potential of bacteria for sea turtle species, as well as for humans. As they are threatened species, it is necessary to have a baseline that allows the care of immunosuppressed and sick animals. Likewise, they allow evaluating the zoonotic potential in the management activities of turtle species, which is of special interest for the staff of the camps installed on the country's beaches.

**Keywords:** Mexican Pacific, cloaca, zoonoses, *Enterobacteriaceae*, spawning.

### III. INTRODUCCIÓN

Las tortugas marinas pertenecen a un grupo de reptiles del Orden Testudinata, compuesto por dos familias y seis géneros (Briseño-Dueñas, 1980). Son organismos migratorios que habitan nichos con diferentes ambientes en el transcurso de su ciclo de vida y en distintas regiones geográficas. A causa del comportamiento migratorio, estos organismos pueden ser susceptibles a amenazas propias de su ambiente y de tipo antropogénico en aguas abiertas y ambientes costeros (Bolten, 2003) que pueden provocarles lesiones, enfermedades y en casos graves, la muerte, por lo que el conocimiento de su microbiota asociada es relevante en temas de conservación (Reséndiz *et al.* 2018).

El término microbiota bacteriana es aplicado para designar a microorganismos que habitan normalmente en los individuos sanos, sin ocasionar invasión. El significado de la microbiota bacteriana que se puede localizar en reptiles se conoce solo cuando se considera la interacción que existe entre los hospederos y el medio ambiente (Snipps *et al.*, 1980).

Las tortugas marinas en vida libre hospedan de manera natural una amplia diversidad de bacterias en su tracto gastrointestinal; sin embargo, también se ha reportado su comportamiento oportunista y patogenicidad (Ahasan *et al.*, 2018).

Existen escasos estudios a nivel mundial sobre microbiota bacteriana en tortugas marinas, por lo que este trabajo permitirá conocer la microbiota bacteriana bucal y nasal de la tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*) y la importancia de conocer las especies de bacterias que pueden representar un riesgo para la salud. En el Sureste del Pacífico Mexicano, específicamente en el estado de Chiapas, no se han realizado estudios sobre la microbiota bacteriana en esta y en otras especies de tortugas marinas. Para éste estudio se plantearon las siguientes preguntas de investigación, ¿Cuáles y cuántas son las especies de bacterias que se encuentran en la boca y la cloaca de *Lepidochelys olivacea*? ¿Cuáles son los porcentajes de los géneros de bacterias se encuentran en la boca y la cloaca de tortuga golfina?. Se conoce poco sobre el efecto de las enfermedades infecciosas bacterianas en las

poblaciones de tortugas marinas en estado natural y sobre el papel que varios microorganismos puedan desarrollar como agentes patógenos. Éste estudio es fundamental para comprender el papel de las bacterias en la salud de las tortugas marinas, y ayudará a desarrollar estrategias para prevenir riesgos de potencial zoonótico, es decir, que causan enfermedades tanto al ser humano como a la fauna doméstica. También se conocerá cuáles de las especies de bacterias identificadas en tortugas marinas pueden representar un riesgo para la salud, principalmente para investigadores como para el personal de los campamentos tortugueros.

En México, el conocimiento de la microbiota bacteriana asociado a tortugas marinas aún es limitado. Por ello, es importante generar información biológica básica acerca de las bacterias que constituyen parte de la biota natural asociada a especies amenazadas, que pueda aplicarse en su manejo. El Santuario Playa de Puerto Arista, se localiza al suroeste del estado de Chiapas, México. Es un Área Natural Protegida y se considera una de las playas más importantes de anidación para la tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*), por lo que es fundamental realizar estudios y aportar información para la conservación de ésta especie. Debido a todo lo anterior, éste estudio tuvo como objetivo general describir la microbiota bacteriana bucal y cloacal de la tortuga marina golfina (*Lepidochelys olivacea*) en el Santuario Playa Puerto Arista, Chiapas, México.

## IV. MARCO TEORICO

### 4.1 Descripción de *Lepidochelys olivacea*

La Tortuga Golfina pertenece al género más pequeño de la familia *Cheloniidae*. Se caracteriza por tener un caparazón casi circular, con una longitud que va de los 67 cm hasta los 78 cm; el ancho de éste es cerca del 90 % de su longitud recta (Márquez-M. *et al.*, 1976) (Figura 1).



Figura 1. Hembra anidante de *Lepidochelys olivacea* en el Santuario Playa de Puerto Arista, Chiapas, México. Autor: Elsy Gabriela Lorenzana Manuel.

Esta especie se caracteriza por presentar una cabeza de tamaño mediano y subtriangular, y además presenta una o dos uñas en el borde anterior de cada aleta. Los neonatos son dorso ventralmente de color gris oscuro a negro; a veces el caparazón y las aletas tienen un borde de color amarillento. Por otro lado, los adultos dorsalmente poseen un color olivo- gris al olivo- amarillento; de igual manera

la cabeza y aletas del mismo color. Mientras que el sitio ventral se distingue por el color crema al gris verdoso claro, con manchas oscuras en los extremos de las aletas. Los partes laterales del cuello en ocasiones son sutilmente amarillento o rosáceo (Márquez y del Carmen Farías, 2000) (Figura 2).

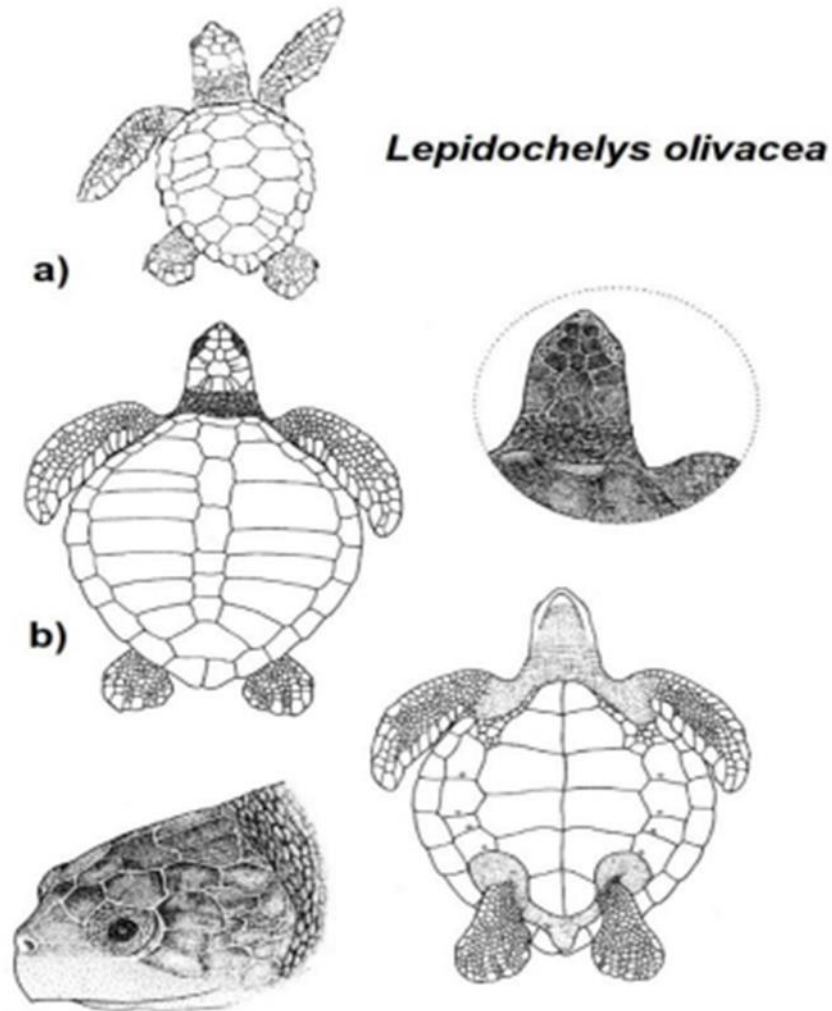


Figura 2. a) Esquema de una cría de *Lepidochelys olivacea*. b) Ilustración de ejemplar en etapa adulta de *Lepidochelys olivacea*. Fuente: Eckert et al. (2000).

Es considerada la especie de tortuga marina más abundante en su área de distribución (Bologaro *et al.*, 2010) (Figura 3). La costa mexicana del Pacífico tiene importantes sitios de anidación para esta especie, principalmente en los estados de Baja California.

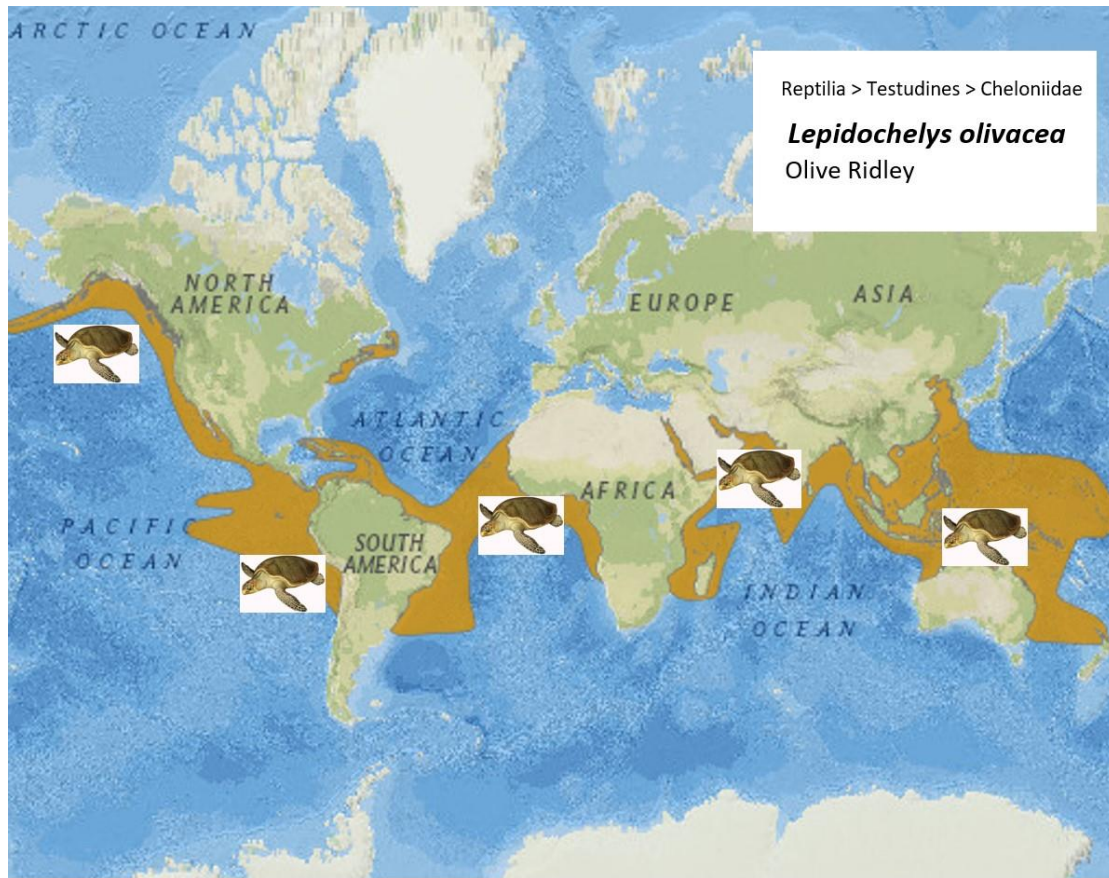


Figura 3. Mapa de distribución de *L. olivacea* a nivel mundial. Modificado de: [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)

Zug *et al.* (2006) mencionan que esta especie alcanza su edad reproductiva a los 13 años de edad aproximadamente, a diferencia de otras especies como por ejemplo *Caretta caretta* que la alcanza a los 30 años (Snover, 2002). El periodo de anidación para esta especie en las costas mexicanas se lleva a cabo durante la temporada junio-febrero, presentando un incremento en septiembre y octubre (Márquez, 2002; García *et al.*, 2003).

Algunas especies pueden oscilar entre aguas tropicales, templadas y subárticas, y llegan a migrar cientos o miles de kilómetros entre sus zonas de alimentación y de reproducción (Choi y Eckert, 2009). En las aguas del Pacífico Oriental, incluyendo las costas del Pacífico Mexicano, se encuentran cinco de las ocho especies existentes de tortugas marinas alrededor del mundo: la tortuga laúd (*Dermodochelys coriacea*), tortuga amarilla (*Caretta caretta*), tortuga carey (*Eretmochelys imbricata*),

tortuga prieta (*Chelonia agassizii*) y la tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*) (López-Castro *et al.*, 2004; Sandoval, 2008; Seminoff y Wallace, 2012) (Figura 4).



Figura 4. Mapa de distribución de las especies de tortugas marinas en México.  
Fuente: Portal ambiental.mx (2022).

*Lepidochelys olivacea* es la especie de tortuga marina de mayor distribución geográfica que anida de junio a diciembre a lo largo de las costas del Caribe, Golfo de México y el Pacífico mexicano. Además, normalmente más de 100.000 hembras arriban a la costa para depositar sus huevos en las playas, con una alta mortalidad de huevos en diferentes etapas de desarrollo (Márquez *et al.* 1989).

#### 4.2 Amenazas para la supervivencia de *L. olivacea*.

Nájera y Salinas (2015) en su estudio de tortugas marinas mencionan las amenazas que afectan directamente a las tortugas:

- Recolecta ilegal de nidos; realizada por el hombre, para uso comestible y comercial de huevos.
- Cacería intencional; para consumo de la carne, aceite y venta del caparazón.



- Pesca incidental; colocación de dispositivos pesqueros que atrapan organismos que no son el objetivo, de manera que ocasionalmente varias especies de tortuga marina caen en las redes.
- Depredación de huevos y neonatos; por animales domésticos y salvajes.
- Enfermedades infecciosas; las tortugas están expuestas a muchas y la más grave y potencialmente riesgosa es la fibropapilomatosis que disminuye las capacidades fisiológicas de las tortugas hasta provocar la muerte (Chacón, 2004).

La principal causa de que las poblaciones de tortugas marinas estén disminuyendo rápidamente se debe a las actividades humanas que desde su existencia han utilizado a estos organismos para consumir su carne y huevos, y venta de su caparazón para rituales religiosos, de tal manera que el consumo que proviene de estas especies se sigue utilizando hasta la actualidad. Sin embargo, la sobre-explotación de huevos y carne se ha incrementado, lo cual provoca que muchas poblaciones no sean viables en estas condiciones (Márquez, 1996).

Hasbún y Vásquez (1995) mencionan las amenazas que afectan el hábitat de estas especies, alterando los ciclos de nutrientes, los flujos de energía y la red trófica:

- La modificación de las playas y promoción turística altera la morfología de la zona costera, instalación de iluminación, introducción de vehículos que incrementan la generación de ruidos, construcción de estructuras, la contaminación y la pérdida de biodiversidad.
- Desechos sólidos y líquidos; esta amenaza puede provenir del espacio inmediato como las comunidades colindantes al mar, pero también de zonas cuenca arriba. Tal es el caso de los desechos que llegan a la playa de las corrientes marinas, provocando una reducción del sitio de anidación, pérdida de hábitat porque en ocasiones constituyen grandes barreras físicas. Los desechos líquidos provocan una gran amenaza en el medio marino, como las aguas residuales, que provienen del sistema de drenaje como detergentes,

blanqueadores, así como los químicos sintéticos asociados a la agricultura, que generan un impacto grave de contaminación. Los derrames de petróleo también constituyen problemas severos para las tortugas y los diferentes hábitats marinos (Chacón, 2004; García, 2011).

#### **4.3 Microbiota bacteriana en tortugas marinas.**

Se ha mencionado que los estudios bacteriológicos en tortugas de vida libre son fundamentales para poder conocer el papel que desempeñan estos microorganismos en las enfermedades infecciosas y cómo afectan la conservación de las poblaciones de tortugas marinas en su hábitat natural (Santoro *et al.*, 2006).

Algunos estudios han descrito que las patologías son procesos que suceden de manera natural, debido a que la calidad de vida en el hábitat de las tortugas marinas predispone a padecer de diversas enfermedades (Orós, 2004).

Las tortugas marinas en vida libre hospedan de forma natural una amplia diversidad de bacterias en su tracto gastrointestinal; sin embargo, también se ha reportado su comportamiento oportunista y patogenicidad (Ahasan *et al.*, 2018).

Snipps *et al.* (1980) así como Lawrence y Needham (1985) analizaron como las especies de bacterias que se aíslan en tortugas marinas con buen estado de salud no presentan diferencias significativas de las que se encuentran en tortugas infectadas.

Se ha descrito que existe poco conocimiento sobre el efecto de las enfermedades infecciosas bacterianas en las poblaciones de tortugas marinas en estado natural, además de la función que diversos microorganismos puedan desarrollar como agentes patógenos (Glazebrook y Campbell, 1990). Del mismo modo, numerosas bacterias han sido identificadas como las causantes de enfermedades en tortugas marinas mantenidas en cautiverio, a pesar de que se conoce que muchos microorganismos pueden ser motivo de una alta mortalidad en otras especies de animales marinos de vida libre. También, muchas de estas bacterias son potencialmente patógenos zoonóticos (Santoro *et al.*, 2003).

#### **4.4 Taxones bacterianos identificados en *L. olivacea***

Algunos estudios han determinado que los principales taxones bacterianos en *L. olivacea* son: *Aeromonas spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Citrobacter spp.*, los cuales son potencialmente patógenos para las tortugas marinas, de manera que, pueden actuar como oportunistas, para ingresar en los tejidos dañados por lesiones o utilizar el estado de estrés de la tortuga, provocando enfermedades graves (Santoro *et al.*, 2003; Orós, 2004). Estos géneros han sido asociados a enfermedad cutánea septicémica ulcerativa, dermatitis papilar, dermatitis focal erosiva, dermatitis ulcerosa traumática, dermatitis necrosante, estomatitis ulcerosa, rinitis obstructiva, queratoconjuntivitis, septicemia, bronconeumonía y osteomielitis.

Se han identificado otros taxones que forman parte de la microbiota natural de las tortugas marinas que no se han reportado potencialmente patógenas para las tortugas (Reséndiz, 2021).

##### **4.4.1 Familia *Enterobacteriaceae***

La familia de las *Enterobacteriaceae*, son comúnmente llamadas enterobacterias, están constituida por bacilos Gram negativos, la mayoría de las especies son móviles y muy pocas inmóviles. De manera que; todas fermentan la glucosa con producción de ácido y gas, y reducen los nitratos a nitritos. Está conformada por bacterias que son aeróbicas, anaerobios facultativos, oxidasa negativa y fermentativas (Collins *et al.*, 2004).

*Enterobacter sp.*

En este género, las bacterias son móviles, con Indol negativo, MR (rojo de metilo) negativa y VP (Voges Proskauer) positivo, por lo que, crece en citrato y no produce H<sub>2</sub>S y la prueba lisina descarboxilasa es negativa. Este grupo de bacterias se encuentra en las aguas residuales y en agua contaminada (Madigan *et al.*, 2003; Collins *et al.*, 2004;).

*Citrobacter sp.*

Esta especie de bacteria es un bacilo Gram negativo, aerobio, es un organismo móvil, variable indol, crece en citrato y es H<sub>2</sub>S positivo, pero la prueba de lisina descarboxilasa se presenta negativa. La hidrólisis de la urea es variable. Este género se presenta frecuentemente en cuerpos de agua, el suelo, y como flora saprófita en el tracto intestinal de animales y humanos. Son microorganismos cosmopolitas, por lo cual son causa frecuente de infecciones importantes, especialmente en huéspedes inmunodeprimidos (Madigan *et al.*, 2003; Collins *et al.*, 2004).

#### *Klebsiella sp.*

El hábitat de este género es el suelo, y el agua. Por esa razón, la mayoría de cepas de *Klebsiella* puede fijar nitrógeno, propiedad que no se encuentra en ninguna otra enterobacteria. Presentan un Indol negativo y el resultado de una lisina descarboxilasa con reacción positiva, pero no produce H<sub>2</sub>S. Es ureasa y β-galactosidasa positivas. Ésta especie se encuentra asociada con infecciones respiratorias graves como la neumonía, Infección abdominal, bacteriemia, endoftalmítis y osteomielitis (Madigan, *et al*, 2003).

#### *Salmonella sp.*

Bacterias Gram negativas, bacilos con flagelos peritricos, son aeróbicas, anaerobios facultativos, oxidasa negativa y fermentativa las enfermedades que causan son: fiebre, náuseas, vómitos y diarrea. (Collins *et al*, 2004).

### **4.4.2 Familia Pseudomonadaceae**

Son oxidasas positivas debido a la presencia de citocromo enzima c oxidasa, poseen flagelos polares y poseen una capacidad para llevar a cabo la fermentación. Las *Pseudomonas* presentan una distribución amplia en el suelo, el agua, las plantas y los animales. *Pseudomona aeruginosa* frecuentemente está presente en pequeñas cantidades en la microbiota intestinal normal y en la piel del ser humano, por lo que es el principal microorganismo patógeno del grupo (Brooks *et al*, 2011).

#### *Pseudomonas sp.*

Esta especie de bacterias son bacilos Gram negativos, móviles y aerobios, algunos de los cuales producen pigmentos hidrosolubles, sin esporas, siempre móviles, por flagelos polares; presentan un metabolismo oxidativo, catalasa positiva y RM-VP negativo. Es considerado un patógeno causante de infecciones en humanos del tracto respiratorio, infecciones en heridas quirúrgicas, enfermedades de la piel e infecciones del trato urinario (Collins et al, 2004; Preseatt *et al*, 2004).

#### **4.4.3 Familia Staphylococcaceae**

Los *Staphylococcaceae* son una *familia* de bacterias Gram positiva que incluyen el género de Estafilococos (*Staphylococcus*) se caracterizan por presentar células esféricas dispuestas en racimos irregulares parecidos a las uvas. Este grupo de bacterias tienen actividad metabólica, por lo que fermentan carbohidratos y producen pigmentos que varían desde un color blanco hasta un amarillo intenso y se desarrollan rápidamente en muchos tipos de medios ambiente (Collins and Lyne's, 2004).

*Staphylococcus sp.*

Son bacterias Gram positivas, aerobios, en relación a su metabolismo, es anaerobio facultativo, coagulasa positivo, oxidasa negativo y catalasa positiva lo que les permite diferenciarse del género *Streptococcus* y otros géneros de cocos Gram positivos, son caracterizados por soportar altas concentraciones de NaCl proporcionando una buena herramienta para su identificación (Collins *et al*, 2004).

#### **4.4.4 Familia Streptococcaceae**

Los estreptococos son bacterias esféricas Gram positivas que de manera característica forman pares o cadenas durante su multiplicación, también son catalasa y oxidasa negativos. Presentan una amplia distribución en la naturaleza. Algunos son miembros de la microbiota normal de los seres humanos, otros están relacionados con enfermedades humanas importantes atribuibles en parte a la infección por estreptococos, y por la sensibilización a ellos. Por lo cual, los estreptococos son un grupo extenso y heterogéneo de bacterias (Brooks *et al*, 2011).

*Streptococcus sp.*

Los estreptococos son cocos Gram positivos, que siempre dividen en el mismo plano, formando pares o en cadenas; son catalasa y oxidasa negativas, no móviles, y algunos están encapsulados. Son anaerobio facultativo y algunos requieren mayor concentración de CO<sub>2</sub>. Algunas especies son causantes de enfermedades respiratorias como faringitis, meningitis y neumonía (Collins *et al*, 2004; Preseatt *et al*, 2004).

#### **4.4.5 Familia *Vibrionaceae***

Esta familia de bacterias está constituida por bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos, muchos de ellos son ligeramente curvos, se encuentra frecuentemente en hábitats acuático (Tortora *et al*, 2007).

*Vibrio sp.*

Este género incluye al menos 40 especies, lo conforman organismos Gram negativos, anaerobios facultativos, poseen un metabolismo fermentativo y rara vez producen gas. Lo que diferencia a este grupo y el del grupo entérico es su carácter de oxidasa positiva y son catalasa positiva, los Vibrios se encuentran de forma natural en el agua dulce y salada. Las especies de este género incluyen microorganismos patógenos tanto para humanos como para peces causando enfermedades estomacales vía de contaminación; aguas contaminadas y alimentos expuestos a aguas contaminadas (Madigan, *et al*, 2003; Collins *et al*, 2004).

#### **4.5 Técnicas de identificación bioquímica de bacterias.**

Fernández *et al.* (2010) realizaron una revisión de los principales métodos y técnicas para la identificación bioquímica de bacterias, las cuales determinan sus características metabólicas.

Las pruebas descritas son la siguientes:

Catalasa: es una enzima que se presenta en la mayoría de los microorganismos que poseen citocromos. De manera que, las bacterias que sintetizan catalasa

hidrolizan el peróxido de hidrogeno en agua y oxigeno gaseoso que se libera en forma de burbujas.

Oxidasa: Esta prueba se utiliza para determinar la presencia de enzimas oxidadas. Por lo que, la reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromo oxidasa que activa la oxidación del citocromo el cual es reducido por el oxígeno molecular produciéndose agua o peróxido de hidrogeno según la especie bacteriana. Por lo general, el sistema citocromo oxidasa únicamente se encuentra en las bacterias aerobias, algunas anaerobias facultativas, pero las bacterias anaerobias estrictas presentan poca actividad oxidasa. De igual manera, la presencia de oxidasa está relacionada a la producción de catalasa, debido a que ésta degrada el peróxido de hidrogeno que se produce a través de la reducción del oxígeno que genera una acumulación tóxica.

Indol: Por medio de esta prueba se identifica la liberación de indol en un cultivo bacteriano. Esta liberación se debe a la degradación del aminoácido triptófano mediante el enzima triptofanasa.

Rojo de metilo: Es un indicador de pH. Actúa entre pH 4,2 y 6,3 presenta una variación desde rojo (pH 4,2) a amarillo (pH 6,3). Por medio de esta prueba se verifica la capacidad de un microorganismo de producir y mantener estables los productos terminales ácidos de la fermentación de la glucosa por la vía de la fermentación ácido-mixta. Se emplea como parte de la identificación a nivel de especie de los bacilos entéricos gramnegativos.

Voges-Proskauer: Esta prueba facilita observar si el microorganismo fermenta la glucosa por la vía butanodiólica. Se genera un producto intermedio (acetoína) que forma un complejo de color rojizo con el  $\alpha$ -naftol. Se usa en la identificación a nivel de especie de bacilos entéricos gramnegativos.

Coagulasa: Permite determinar la capacidad de coagular el plasma por la acción de la enzima coagulasa. De modo que se utiliza para diferenciar *S. aureus* (coagulasa positivo) de otras especies de Staphylococcus. La prueba de la coagulasa en tubo se puede leer tras incubación de 4h, pero si es negativa debe incubarse hasta 24h.

Prueba de CAMP: Es útil principalmente para determinar la capacidad de un microorganismo para producir una proteína conocida como factor CAMP. La proteína produce un efecto sinérgico con la  $\beta$ -hemolisina de *S. aureus* sobre eritrocitos ovinos y bovinos que se observa como un fenómeno lítico en la intersección de los dos microorganismos cuando se siembran en proximidad. Como alternativa se puede utilizar el CAMP inverso. En esta prueba la hemólisis producida por algunos microorganismos se inhibe por la  $\beta$ -hemolisina de *S. aureus*.

Otra de las técnicas más utilizadas para identificación bacteriana es la siguiente:

#### **4.6 Técnica de Tinción de Gram.**

Rodríguez y Arenas (2018) realizaron una nota científica sobre el médico danés Hans Christian Gram quien desarrolló la más importante tinción bacteriológica, conocida como la técnica de tinción de Gram.

Ésta técnica diferencia a las bacterias en dos grandes grupos. Las bacterias Gram positivas son aquellas que retienen la tinción cristal-violeta, y se denomina bacterias Gram negativas a las que se decoloran y después se tiñen con safranina.

Esta diferencia de tinciones se debe a la estructura de las paredes celulares de ambos tipos de bacterias, por esta razón las bacterias Gram positivas presentan una pared gruesa compuesta de peptidoglucanos y polímeros, e impermeable, que hace que resista la decoloración. En cambio, las bacterias Gram negativas tienen una capa delgada de peptidoglucanos más una bicapa de lipoproteínas que se puede deshacer con la decoloración.



## V. ANTECEDENTES

Existen escasos estudios a nivel mundial sobre microbiota bacteriana en tortugas marinas. Los pocos estudios se han enfocado en determinar la microbiota en cavidad nasal, cloacal, bucal, en huevos, ocular, caparazón y aletas en lugares como Costa Rica, El Salvador, EUA y México. Recientes investigaciones a nivel mundial son las de:

Santoro *et al.* (2006) realizaron un estudio en tres playas de Costa Rica, donde obtuvieron muestras bacteriológicas de 45 hembras anidantes en la cavidad nasal y cloacal de *Lepidochelys olivacea* con un total de 99 aislamientos bacterianos, del total 35 bacterias encontradas en la cloaca y 64 en las cavidades nasales; *Aeromonas spp.* fue el microorganismo más frecuentemente aislado en la cloaca, seguido de *Citrobacter freundii*, *Salmonella spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Nájera-Abarca y Salinas-Guzmán (2015), en una playa de El Salvador determinaron la microbiota bacteriana de *L. olivacea* con un total de 20 hembras anidantes, se identificaron 18 géneros bacterianos, en total 3 Gram positivos y 15 Gram negativos. Las bacterias más frecuentes identificadas en las cavidades nasales fueron *Staphylococcus sp*, *S. aureus* y *Klebsiella sp* y en el área cloacal *Vibrio sp*, *Salmonella sp* y *Escherichia coli*.

En el caso de México se han realizado estudios en los estados de Veracruz, Colima, Baja California Sur, como los que se describen a continuación:

Serrano *et al.* (2012) realizaron un estudio en Barra Galindo, Tuxpan, Veracruz, se tomaron muestras bacteriológicas de hembras anidantes, crías y de los nidos. En total se obtuvieron 14 especies de bacterias, de las cuales diez fueron Gram negativas y cuatro Gram positivas. Las especies identificadas fueron: *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus sp.*, *Citrobacter sp.*, *Edwardsiella sp.*, *Enterobacter sp.*, *Escherichia coli*, *Flavobacterium sp.*, *Mycobacterium sp.*, *Proteus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Salmonella sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus aureus* y *Vibrio*

*alginolyticus*. Las cuatro bacterias más frecuentes fueron: *Edwardsiella sp.*, *Escherichia coli.*, *Salmonella sp.* y *Vibrio alginolyticus*.

Vivaldo *et al.* (2009) a través de una investigación reportaron patologías en once tortugas marinas Golfinas (*Lepidochelys olivacea*), que arribaron a las playas de Cuyutlán, Colima, México. En los resultados una de las patologías fue dermatitis ulcerativa necrótica bacteriana.

Reséndiz *et al.* (2019) mediante un estudio determinaron la presencia de agentes infecciosos, potencialmente patógenos y zoonóticos mediante estudios microbiológicos en tortugas *Caretta caretta* en el Golfo de Ulloa, Baja California Sur, México. Se capturaron 56 ejemplares, y se realizaron raspados orales, en lesiones corporales y cloaca con hisopos estériles. En total, se obtuvieron 77 aislamientos de enterobacterias Gram negativas de 10 géneros distintos. Los géneros aislados más abundantes fueron *Citrobacter freundii* en la boca de las tortugas, *Enterobacter spp.* y *Proteus mirabilis* en las aletas anteriores y en la cloaca.

Específicamente para el Sureste del Pacífico Mexicano en particular en el estado de Chiapas, no se han llevado a cabo estudios de éste tipo. Sin embargo, se ha realizados trabajos de conservación que incluyen recolección de nidos y su incubación en corrales dentro de los campamentos tortuguero.

Mejía Ruiz (2020) realizó un estudio en donde caracterizó la anidación de *Lepidochelys olivacea* en el año 2014 y 2015 en las playas de Puerto Arista, Tonalá, Chiapas. Los resultados que se obtuvieron en el año 2014 reportaron 6,893 nidos con un total de 521 405 huevos recolectados, promediando 85.65 huevos por nido (h/n); para el año 2015 se consiguió un total de 4 756 nidos, con 429 826 huevos con un promedio de 91.61 h/n.

## **VI. OBJETIVOS E HIPÓTESIS**

### **6.1 OBJETIVO GENERAL**

Describir la microbiota bacteriana bucal y cloacal de la tortuga marina golfina (*Lepidochelys olivacea*) en el Santuario Playa Puerto Arista, Chiapas, México.

### **6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Elaborar un listado taxonómico de las especies de bacterias presentes en la cavidad bucal y cloacal de *L. olivacea*.
2. Comparar la riqueza y frecuencia de aparición de los taxones bacterianos en la cavidad bucal y cloacal de *L. olivacea* y entre los meses de muestreo.
3. Determinar el efecto de las tallas en hembras anidantes sobre la riqueza microbiana.

### **6.3 HIPÓTESIS**

Debido a estudios que se han realizado anteriormente, en este trabajo de investigación se espera encontrar una mayor riqueza en los grupos de bacterias encontradas en la cavidad bucal de *L. olivacea*, que en la cavidad cloacal.

## VII. ZONA DE ESTUDIO

El Santuario Playa de Puerto Arista, se localiza en el municipio de Tonalá, al suroeste del estado de Chiapas, México. Es un área natural protegida federal que cuenta con una superficie de 726.53 hectáreas y está comprendida dentro de una línea costera de 30 km en el litoral de Chiapas, que abarca las bocabarras de Paredón y Boca del Cielo. Está ubicado entre las coordenadas centrales latitud 16°00'05.8"N y longitud 93°53'06.00"W (Figura 5). Colinda al Norte con las localidades de Cabeza de Toro, Belisario Domínguez, El Paraíso, Ignacio Allende, Lázaro Cárdenas, Miguel Hidalgo II y Puerto Arista, al Sur con el Océano Pacífico, al Este con la localidad de Boca del Cielo y al Oeste con la laguna de Mar Muerto. Se ubica en la región fisiográfica de la planicie costera del pacífico (Arroyo-Chacón, 2019).

Es un sitio designado como humedal de importancia internacional RAMSAR No. 1823 "Sistema Estuarino de Puerto Arista" (RAMSAR-CONANP, 2017). Por otra parte, el Santuario se considera una de las playas más importante de anidación para la tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*), aunque también se presenta anidación de la tortuga prieta (*Chelonia mydas*) y tortuga laúd (*Dermochelys coriacea*) en Chiapas (CONANP, 2018).

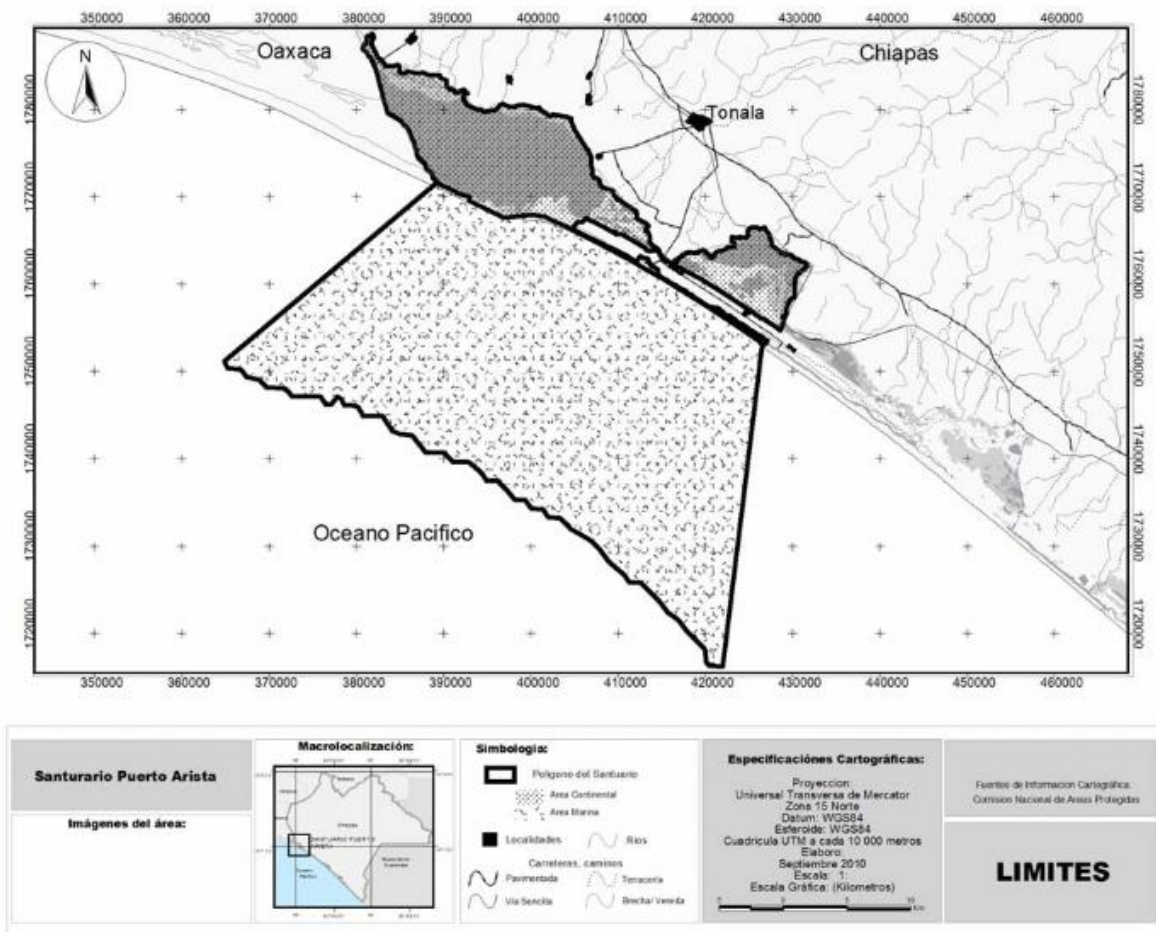


Figura 5. Localización del área de estudio Santuario Playa de Puerto Arista, Chiapas, México. Fuente: CONANP, 2014

## Clima

Los climas presentes son el cálido subhúmedo, de humedad media A(W1) y el cálido subhúmedo con lluvias en verano de mayor humedad A(W2). La temperatura anual promedio es de 28.1°C. La precipitación anual es de 1535.8 mm. Distribuida en dos estaciones marcadas durante el año: la húmeda de mayo a octubre y la seca de noviembre a abril. Los vientos que se presenta provienen del Pacífico y están influenciados por las corrientes del Suroeste y Norte del País (CONANP, 2012).

## Vegetación

La vegetación que caracteriza a la Playa de Puerto Arista de acuerdo a Miranda (1952) y Breedlove (1981) es la duna costera, la cual es considerada como vegetación invasora, debido a que coloniza lugares inestables en donde se presenta una gran dinámica de transporte de arenas por erosión eólica.

Los tipos de vegetación presentes en el Sistema Estuarino Puerto Arista se encuentra clasificados con base a lo establecido por el CONANP (2023) encontrando los siguientes: Manglares, Selva Baja Caducifolia, Selva Baja Espinosa Caducifolia, Selva Mediana Subperennifolia y Pastizal inducido, que se describen a continuación:

**Manglar:** El Sistema Estuarino tiene una extensión de 7,146.76 hectáreas, los manglares están representados en el Sistema Lagunar Mar Muerto. En este tipo de vegetación se encuentran cuatro especies: mangle rojo (*Rhizophora mangle*) el más abundante, mangle botoncillo (*Conocarpus erectus*), mangle blanco (*Laguncularia racemosa*) y madre sal o negro (*Avicennia germinans*). El mangle rojo alcanza su mejor desarrollo en sitios expuestos a cambios constantes de nivel de agua y salinidad. Finalmente, *Avicennia bicolor* es una especie de distribución restringida para esta región del estado de Chiapas (CONANP, 2012).

**Selva Baja Caducifolia:** En el Sistema Estuarino, este tipo de vegetación se ubica en algunos sitios de la franja costera que da a la playa. Se identifica por un estrato arbóreo que alcanza una altura de 8 metros, las especies más comunes son el

mezquite (*Prosopis juliflora*), guamúchil (*Pithecellobium dulce*), huizache (*Acacia farnesiana*), sangre de perro (*Croton sp.*), entre otros.

**Selva Baja Espinosa Caducifolia:** Es el tipo de vegetación que crece cerca de la costa; se caracteriza por presentar mayor abundancia de cactáceas y agaves capaces de vivir con poca agua, y un elevado número de plantas cubiertas de espinas como protección contra animales herbívoros. Muchas especies leñosas de esta vegetación son aprovechadas básicamente para producción de carbón y leña y para construcciones rústicas.

## **Fauna**

En el sitio Ramsar 1823, se registraron 464 especies de vertebrados, representan 144 familias y 279 géneros, distribuidos en 114 especies de peces, 18 de anfibio, 68 de reptiles, 238 de aves y 26 de mamíferos. Esta riqueza equivale al 13.90% de la fauna de México y el 33.09% de la registrada para Chiapas.

**Peces:** La ictiofauna del sitio está representada por 44 familias, 77 géneros y 114 especies. Se encuentran las siguientes especies como el robalo (*Centropomus sp*), la lisa (*Mugil cephalus*), el pargo (*Lutjanus sp*), varias especies de mojarra (*Cichlasoma sp.*)

**Anfibios:** Se encuentran representados por ocho familias, 12 géneros y 18 especies de las cuales el sapo boca angosta huasteco o ranita de hojarasca (*Gastrophryne usta*), la Cecilia mexicana (*Dermophis mexicanus*), el Sapo chichito (*Incilius coccifer*), el Sapo excavador (*Rynhophrynus dorsalis*), y la Rana Leopardo de zacate (*Lithobates forreri*).

**Reptiles:** Este grupo está representado por 18 familias, 57 géneros y 68 especies que incluyen seis amenazadas, 18 sujetas a protección especial y cuatro en peligro de extinción de acuerdo con la NOM-059-SEMARNAT-2010. Además de las tortugas marinas otras especies representativas son la mazacuata (*Boa constrictor*), el turipache (*Corytophanes percarinatus*), la iguana negra (*Ctenosaura pectinata*) y la falsa nauyaca (*Trimorphodon biscutatus*); especies sujetas a protección especial

son el pululo o caimán (*Caiman crocodylus*), el cocodrilo de río (*Crocodylus acutus*); la tortuga casquito (*Kinosternon scorpioides*) y las serpientes cantil (*Agkistrodon bilineatus*), el cascabel tropical (*Crotalus durissus*) y la iguana verde (Iguana iguana).

**Aves:** Este grupo está representado por 59 familias, 163 géneros y 238 especies que incluyen 24 en riesgo. Las especies representativas del sitio son las aves residentes como el cigüeñón (*Mycteria americana*), el combatiente (*Jacana spinosa*), el ibis blanco (*Eudocimus albus*), la pato aguja (*Anhinga anhinga*), otras aves que son muy escasas como la espátula rosada (*Platalea ajaja*).

**Mamíferos:** Las especies de mamíferos se encuentran representados en 17 familias, 22 géneros y 26 especies, Entre la mastofauna representativa del sitio Ramsar se encuentran el mapache (*Procyon lotor*), el tlacuache (*Didelphys sp*), el armadillo (*Dasyus novemcinctus*) y el venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*) y la zorra gris (*Urocyon cinereoargenteus*).

### **Población y Aspectos socioeconómicos**

Al interior del polígono del área protegida existen 41 localidades, que suman 8,416 habitantes (INEGI, 2010). Las actividades económicas primarias se basan en la agricultura, silvicultura, ganadería y pesca, seguidas del turismo.

**Pesca:** La pesca es la actividad principal dentro del sitio Ramsar, debido a que las lagunas costeras ocupan el 70% del área, la Laguna Mar Muerto es considerada una de las más productivas, lo que se refleja en la importancia de ésta para la pesca (Cardenas *et al.*, 2006).

**Turismo:** La zona cuenta con playas, siendo Puerto Arista, el destino de mayor afluencia en el estado de Chiapas, sólo en Semana Santa se ha registrado el ingreso de más de 100,000 personas por periodo al año, cuenta con una capacidad instalada para ofertar servicios turísticos como son 35 hoteles con 471 habitaciones y 35 restaurantes.



**Ganadería:** Esta actividad se realiza en forma extensiva en zonas aledaña y por su clima está considerada como de alto riesgo, debido a que predominan fuertes vientos que causan incendios forestales y provocan el calentamiento y sequedad de las llanuras, así como una fuerte erosión de los suelos.

### **Tipo de marea y amplitud de playa**

De acuerdo con los datos de la estación mareográfica más cercana al área de estudio (Salina Cruz, Oaxaca) la marea es mixta semidiurna, y entre el nivel de pleamar media y el de bajamar media la amplitud es de 1.094 m (Instituto de Geofísica, 1978).

La playa es extensa en amplitud con una pendiente muy suave (1 a 2%) hacia el noroeste y más angosta con una pendiente de 2 a 3% hacia el sureste (Magdaleno, 2006). El ancho de la playa arenosa varía de 119.4 a 189.3 metros, desde el rompiente de la ola hasta donde inicia la zona de dunas (Ramírez *et al.*, 2018).

## **VIII. MÉTODO**

### **Localización de ejemplares de tortuga golfina**

La búsqueda de ejemplares de hembras adultas de tortuga golfina se hizo en el periodo agosto-diciembre de 2021, durante los recorridos de monitoreo biológico que hace la Secretaría de Medio Ambiente e Historia Natural (SEMAHN), en el periodo de temporada alta de anidación; para la búsqueda se usó una lámpara de luz roja para ir localizando el rastro que deja el ejemplar cuando sale anidar. Los recorridos tuvieron una duración de 7 horas por noche, a lo largo 30 km de playa, desde la bocabarra de Boca del Cielo hasta la de Paredón, con un total de 23 tortugas muestreadas.

### **Colecta de muestras biológicas.**

#### **1. Obtención de muestras de cloaca y boca.**

Las muestras se obtuvieron durante el desove de cada tortuga, y en el transcurso de este proceso se escarbó un canal detrás de la hembra para poder insertar el hisopo, mientras el animal permanecía en posición decúbito ventral. El hisopo se introdujo directamente en la cloaca durante 15 segundos, frotando suavemente entre la mucosa de la pared (Figura 6, inciso d). Se retiró el hisopo y se colocó en un medio de transporte Stuart que permite la conservación de hasta 72 horas.

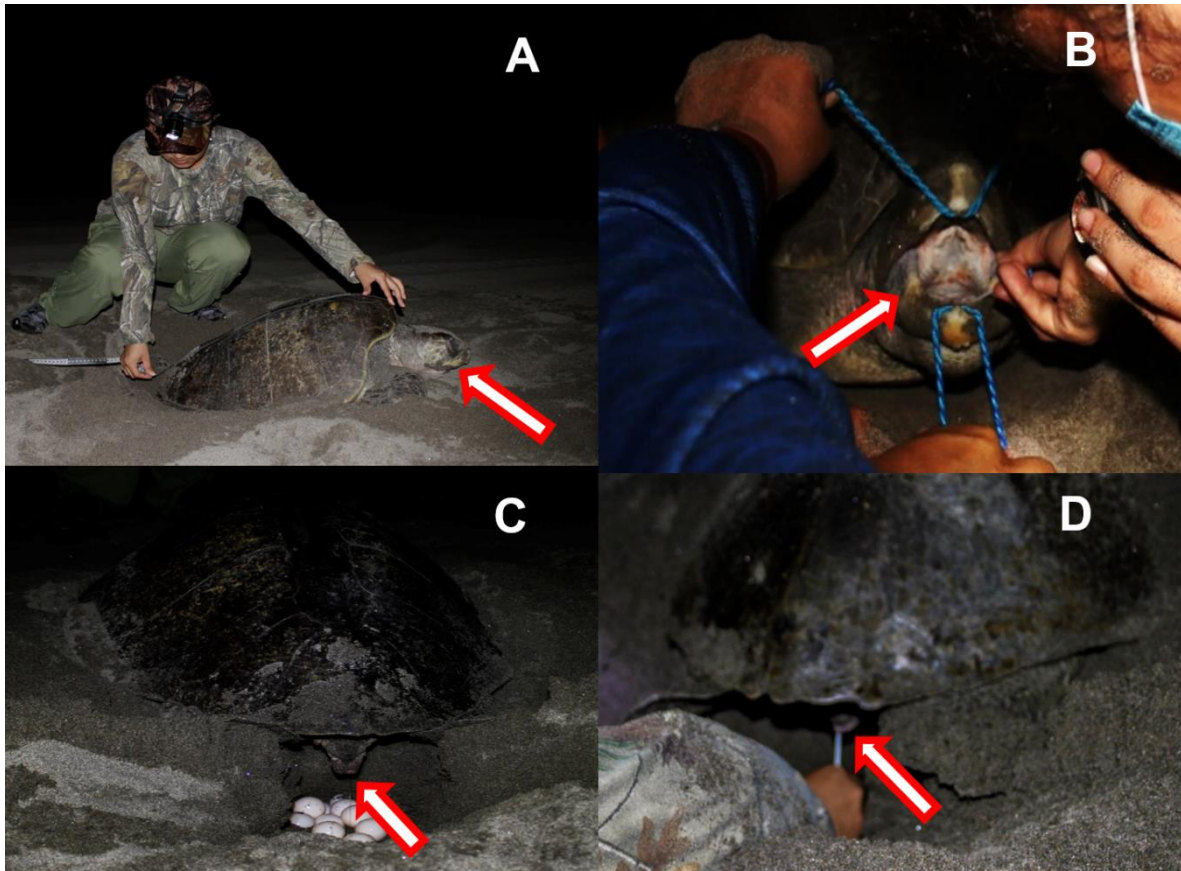


Figura 6. Obtención de muestras bacterianas en hembras anidantes de la tortuga golfina (*L. olivacea*). A) Región cefálica y área bucal de la tortuga golfina, B) Toma de muestra en cavidad bucal, C) Región de la cloaca de hembra anidante de tortuga golfina, D) Toma de muestra en cavidad cloacal con hisopo estéril

Las muestras de la cavidad bucal se obtuvieron también durante el desove de la tortuga. Para ello se abrió la boca colocando dos cuerdas en los extremos superior e inferior de la boca, posteriormente se introdujo un hisopo estéril en la cavidad interna por 10 segundos, y se colocó en un tubo de ensayo con medio de transporte Stuart (Figura 6, inciso b).

Finalmente se registraron los datos morfométricos tales como el Largo y Ancho curvo del Caparazón de la tortuga (LCC y ACC, respectivamente) (Figura 7).



Figura 7. Toma de medidas morfométricas de LCC Y ACC en hembra anidante

Las muestras recolectadas se etiquetaron con los siguientes datos: clave de la tortuga, nombre del sitio de muestreo, área de la muestra, fecha y hora. Posteriormente las muestras fueron trasladadas directamente al Laboratorio de Biología molecular y genética de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (UNICACH) en Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, en un periodo menor a 48 horas.

#### **Siembra y aislamiento de bacterias aeróbicas.**

En esta parte del estudio, los hisopos (con la muestra de boca y cloaca) se colocaron en agua peptonada alcalina y se incubaron a 34°C durante 24 h. Posteriormente se resembraron por estría cruzada en agar MacConkey, el cual es un medio selectivo que se utiliza para el aislamiento de bacilos Gram negativos y agar TCBS, medio selectivo y diferencial para el aislamiento de las especies del género *Vibrio* (Figura 8, inciso a). Se incubaron los medios a una temperatura de 34°C por 24 horas. Si el crecimiento bacteriano resultó escaso o nulo, se procedió a incubar 24 horas más.

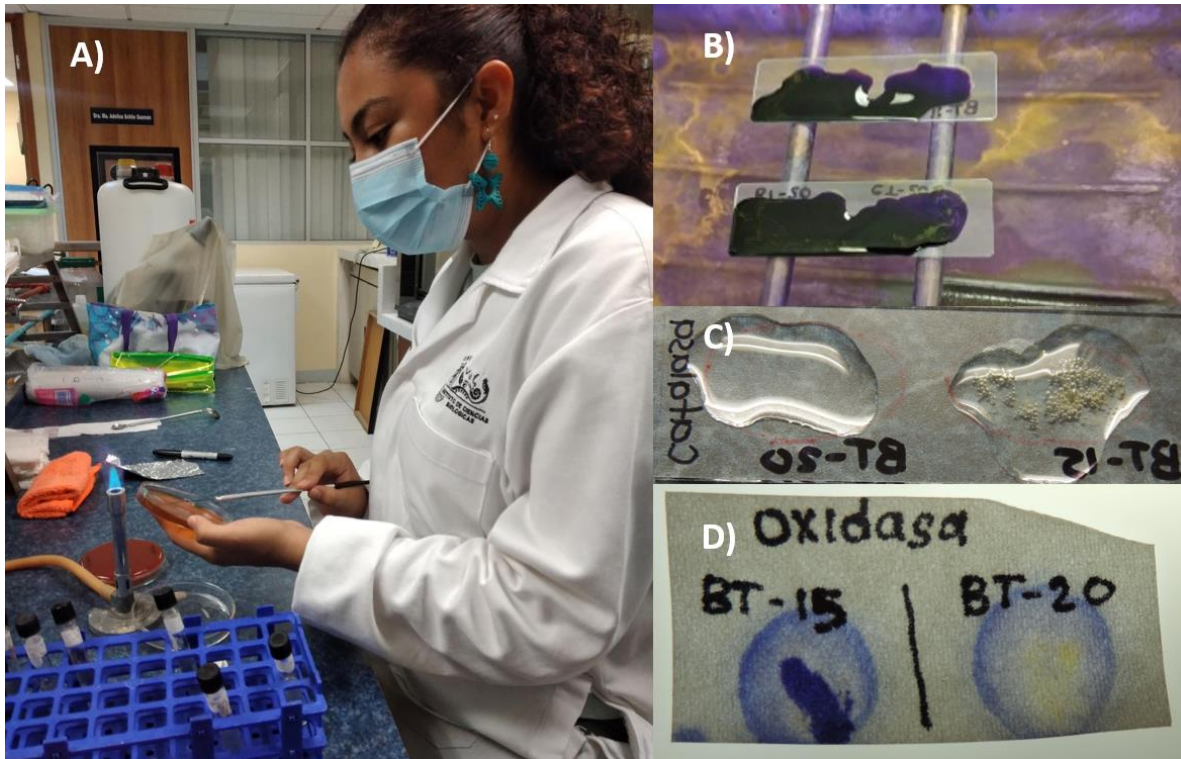


Figura 8. Proceso para la identificación de las muestras A) Siembra de bacterias aeróbicas en Agar MacConkey, B) técnica de tinción de Gram, C) prueba de catalasa, D) prueba de oxidasa

Se describieron las colonias aisladas en los diferentes medios y se realizó la técnica de tinción de Gram (Figura 8, inciso b). El análisis de las laminillas se hizo con un microscópico óptico con objetivo de inmersión (100x). Al mismo tiempo se hicieron las pruebas de Catalasa y Oxidasa. Para la prueba de Catalasa, se obtuvo una muestra de colonia de bacterias con el asa, y se realizó un frotis en seco en el portaobjetos y posteriormente se agregaron una o dos gotas de agua oxigenada al 30% (Figura 8, inciso c). La reacción se interpretó de la siguiente manera: si hubo efervescencia rápida con desprendimiento de burbujas, se consideró como resultado positivo; mientras que la ausencia de efervescencia se interpretó como negativo. Para el caso de la prueba de Oxidasa, se agregó una o dos gotas del reactivo *Oxidase Reagent Droppers*, y posteriormente se tomó una muestra de colonia bacteriana la cual se extendió sobre un trozo de papel filtro; se esperó la producción de la reacción entre 5 y 10 segundos. Al presentarse un color purpura o

violeta, se interpretó como resultado positivo, y si este resultaba incoloro o amarillo se interpretó como resultado negativo (Figura 8, inciso d)

La identificación de las bacterias se realizó mediante las pruebas bioquímicas estándares propuestas por Bisping y Amtsberg (1988). La identidad taxonómica de las bacterias Gram-negativas se confirmó mediante el sistema API20E (*Biomérieux*) (Figura 9). Para esto, se introdujo una suspensión bacteriana (hecha con una colonia aislada disuelta en 5 mL de NaCl al 0.9%) en los tubos de la galería con ayuda de una pipeta, y posteriormente se incubaron durante 24 horas a  $36\pm 2^{\circ}\text{C}$  (Figura 9). Después de la incubación, la lectura de la galería se hizo remitiéndose a la Tabla de Lectura provista por API20E (*Biomérieux*), en donde se obtuvo un perfil numérico de 7 cifras que resulta de la suma de los valores correspondientes a las pruebas positivas, asignados previamente en la planilla (Figura 9). El código obtenido correspondió a un determinado género o especie de acuerdo al catálogo de identificación bacteriana. La identificación de las bacterias Gram positivas se realizó utilizando pruebas bioquímicas como catalasa, coagulasa y prueba de CAMP.



Figura 9. Uso del sistema miniaturizado API20E (BIOMÉRIEUX) para identificación de bacterias Gramnegativas

Para el análisis estadístico, se construyeron matrices de datos en Excel para registrar información recolectada por organismo por meses y cavidades (GUTIERREZ-JIMENEZ, JAVIER; Lorenzana Manuel, Elsy Gabriela; Romero Berny, Emilio Ismael; López Vila, Jesús Manuel (2023), “Bacterial microbiota of *Lepidochelys olivacea* at the Puerto Arista beach-CHIAPAS”, Mendeley Data, V1, doi: 10.17632/j7d5sg9scv.1). La información sobre frecuencia de los taxones se presentó en gráficos de barras y pasteles. Para comparar la frecuencia de los taxones identificados entre las dos cavidades, primero se aplicó una prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov a los datos, y al no detectar su normalidad se aplicó una prueba de Mann-Whitney a un nivel de significancia de 0.05. Para detectar diferencias en las frecuencias de los taxones entre los cuatro meses de muestreos se aplicó una prueba de ANOVA de una vía, al detectarse normalidad en los datos. Para determinar la relación entre la morfometría de las tortugas y la riqueza bacteriana encontrada, se utilizó un análisis de correlación de Pearson. Los análisis estadísticos para esta tesis se realizaron en el programa PAST versión 4.04 (Hammer *et al.*,2001).



## IX. RESULTADOS

### Listado taxonómico de la microbiota bacteriana

En ésta tesis se identificaron un total de 18 taxones bacterianos, de los cuales cinco son géneros, lográndose identificar hasta 13 especies. Para la cavidad bucal, se obtuvieron un total de 17 taxones, de los cuales cinco solo se identificaron a género. En la cavidad cloacal se obtuvieron un total de seis taxones; dos se identificaron a género y cuatro a nivel de especie. La lista taxonómica y la cavidad en donde se encontraron las bacterias se presenta en el cuadro 1.

Cuadro 1. Lista taxonómica de la microbiota bacteriana de *Lepidochelys olivacea* en Playa Puerto Arista, Chiapas. Celdas sombreadas en gris indican distribución en determinada cavidad.

TAXON	Cavidades en <i>Lepidochelys olivacea</i>	
	Cavidad bucal	Cavidad cloacal
<i>Vibrio alginolyticus</i>		
<i>Achromobacter sp.</i>		
<i>Citrobacter diversus</i>		
<i>Citrobacter freundii</i>		
<i>Citrobacter sp.</i>		
<i>Enterobacter agglomerans</i>		
<i>Escherichia coli</i>		
<i>Enterobacter cloacae</i>		
<i>Enterobacter sp</i>		
<i>Klebsiella ozaenae</i>		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		
<i>Pseudomona aeruginosa</i>		
<i>Staphylococcus epidermis</i>		
<i>Salmonella sp</i>		
<i>Serratia odorífera</i>		
<i>Serratia sp</i>		
<i>Streptococcus viridans</i>		
<i>Shigella boydii</i>		

Con respecto al tipo de pared bacteriana, se encontró que 16 taxones corresponden a bacterias Gramnegativas, mientras que solo dos taxones pertenecen al grupo de las Grampositivas. Para el caso de cada una de las cavidades analizadas en las tortugas se muestran los números y porcentajes de bacterias Gramnegativas en la figura 10–A y de las Grampositivas en la figura 10-B.

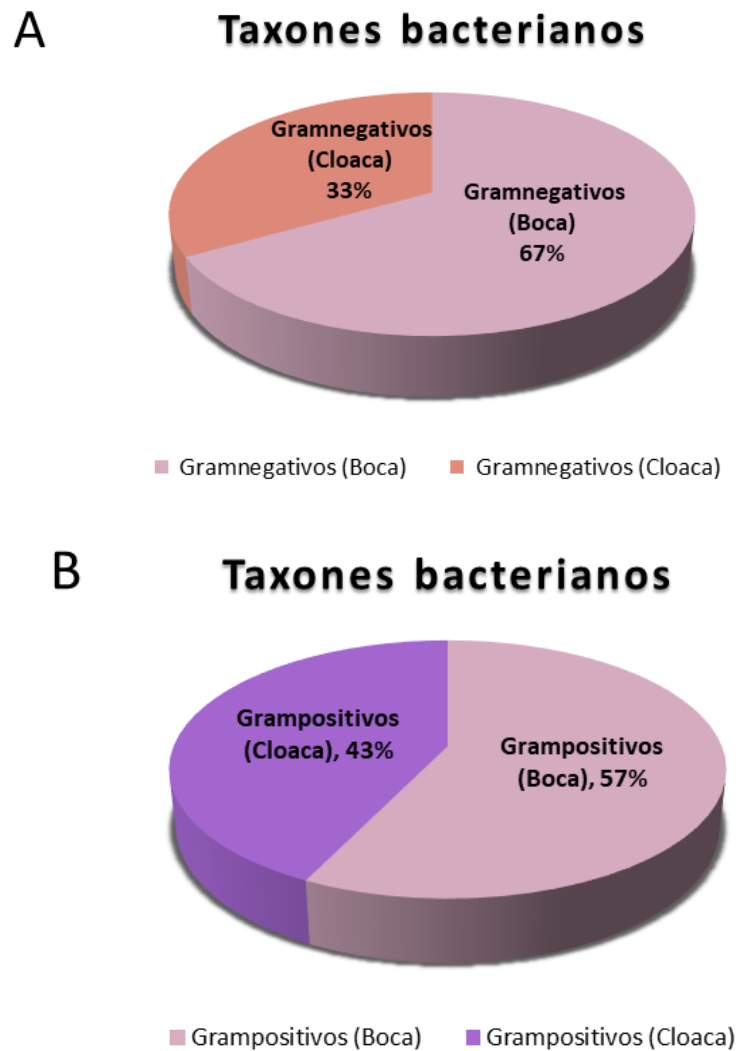


Figura 10. Frecuencia y porcentaje de taxones Gramnegativos (A) y Grampositivos (B) encontrados por cavidades de *L. olivacea*.

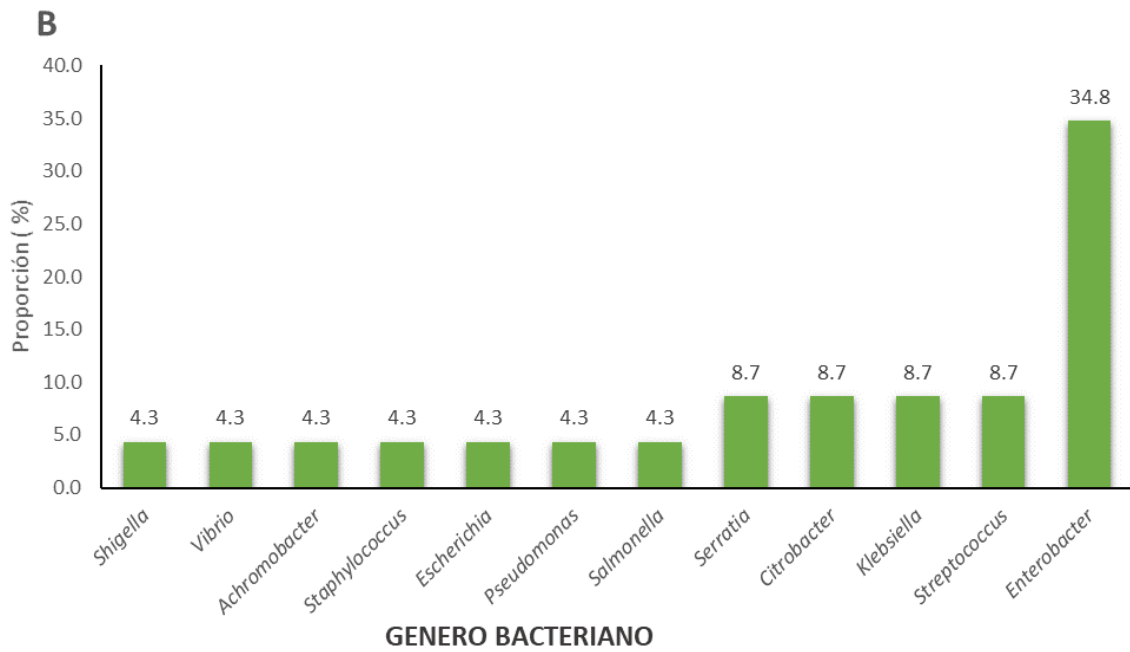
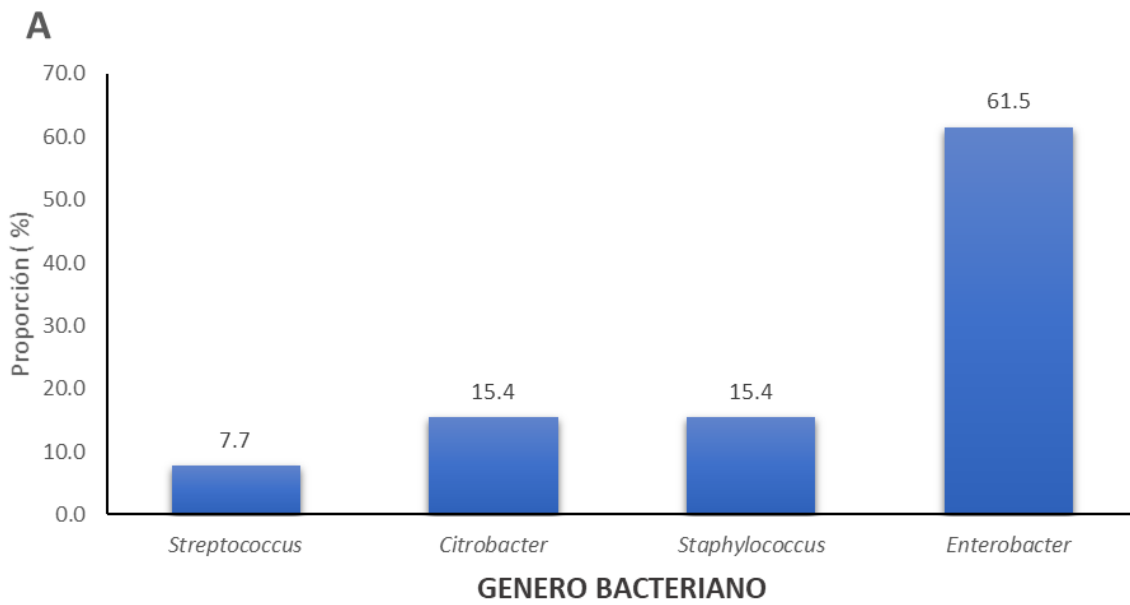


Figura 11. Proporción (%) de géneros encontrados en cavidad cloacal (A) y en cavidad bucal (B) de *L. olivacea*.

### Comparación de frecuencias entre cavidades y meses de muestreo

En la prueba de comparación de medias de las frecuencias, se detectó no normalidad en los datos según la prueba de Kolmogorov-Smirnov ( $D=0.66$ ,  $P=0.002$ ). En la prueba de Mann-Whitney se detectaron diferencias significativas en las frecuencias de los taxones entre la cavidad bucal y cloacal (Mann-Whitn  $U=33$ ,  $P=0.02$ ).

Entre los meses de muestreos no se detectaron diferencias significativas en la frecuencia de los taxones (ANOVA,  $F=1.18$ ,  $P=0.33$ ). En la figura 10 se muestra las frecuencias relativas de cada género bacteriano obtenidas por cada mes.

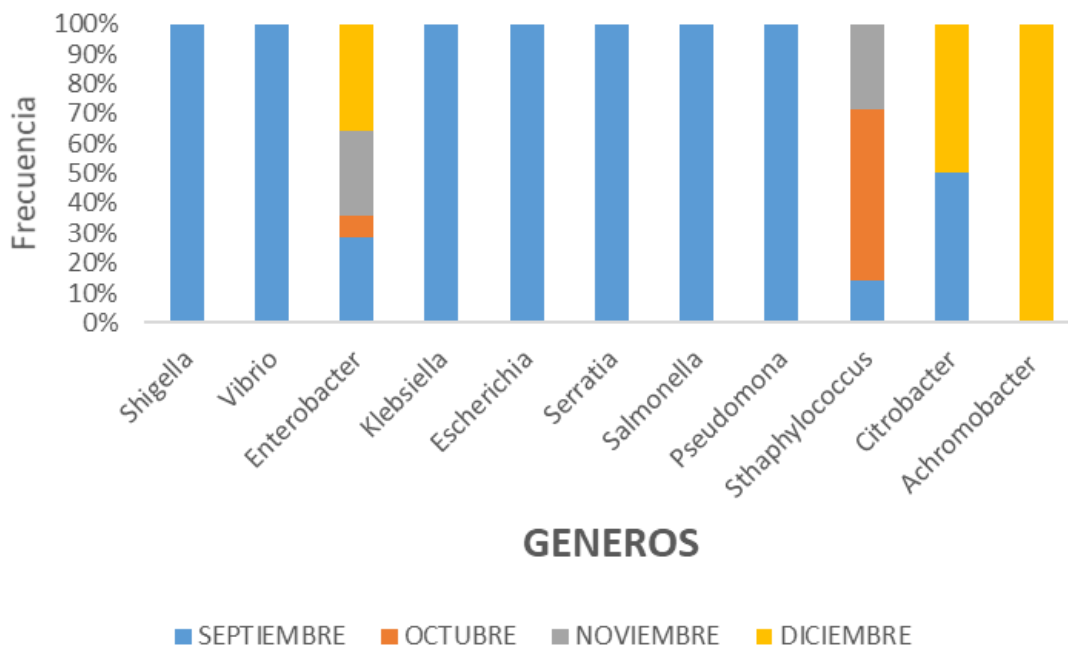


Figura 12. Frecuencia relativa de géneros bacterianos obtenidos por mes de muestreo.

### Relación de las tallas de *L. olivacea* con la microbiota bacteriana.

En el cuadro dos se presentan los valores medios, máximo y mínimo para las medidas morfométricas de Largo Curvo del Caparazón (LCC) y Ancho Curvo del Caparazón (ACC) del total de 23 hembras medidas.

Cuadro 2. Valores medios (Desv. Estándar), mínimos y máximos del Largo Curvo del Caparazón (LCC) y Ancho Curvo del Caparazón (ACC) de hembras anidantes de *L. olivacea*. N: número de hembras muestreadas.

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. estandar
LCC	23	65.00	71.50	70.03	1.84
ACC	23	61.00	72.00	65.39	3.17

Respecto al análisis para evaluar la relación entre la morfometría de las tortugas y la riqueza bacteriana se encontró que en el análisis de correlación de Pearson el valor del coeficiente más alto fue el de la relación riqueza con el Ancho Curvo del Caparazón, la cual resultó significativa. Por el contrario, la relación de riqueza con el Largo Curvo del Caparazón la relación fue baja y ésta no resultó significativa (Cuadro 3).

Cuadro 3. Valores de los coeficientes de correlación de Pearson (r) entre la riqueza taxonómica bacteriana con la información morfométrica del Largo Curvo del Caparazón (LCC) y Ancho Curvo del Caparazón (ACC) de hembras anidantes de *L. olivacea*. Valor de  $P > 0.05$  es significativo.

	ACC	LCC
<b>r</b>	-0.58	0.09
<b>P</b>	<b>0.01</b>	0.72

## X. DISCUSIÓN

De acuerdo a la hipótesis planteada en ésta investigación, se esperaba encontrar una mayor riqueza taxonómica de bacterias en la cavidad bucal que en la cloacal. En éste estudio se caracterizaron 17 taxones bacterianos en la cavidad bucal de *L. olivacea*, y seis en la cavidad cloacal, por lo que la hipótesis es aceptada.

Algo importante en éste estudio, es que se encontraron diferencias en la riqueza taxonómica de ambas cavidades. Una explicación de ello se debe a que la microbiota oral es potencialmente menos estable y la cavidad bucal suele ser más propensa a adquirir taxones microbianos externos, en comparación con la microbiota cloacal relativamente estable (Filek, *et al.*, 2021). También cabe mencionar que la microbiota oral es más sensible a los cambios ambientales que la microbiota cloacal, y que retiene una parte de los taxones microbianos independientemente del cambio de la naturaleza (Pace *et al.*, 2019). Ésta diferencia entre taxones de cavidades ha sido reportada también para otras especies como la tortuga boba (*Caretta caretta*) por Filek, *et al.*, (2021).

Con respecto a la composición taxonómica de las bacterias en la cavidad bucal en éste estudio se encontraron algunos como: *Klebsiella ozaenae*, *K. pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter sp*, *Pseudomona aeruginosa*. Éstos taxones coinciden con lo que reporta Reséndiz (2021) en su estudio de identificación bioquímica de bacterias en las tortugas negras (*Chelonia mydas*) del Pacífico Mexicano.

En cuanto a la composición taxonómica de las bacterias en la cavidad cloacal en éste estudio se encontraron algunos como: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Pseudomona aeruginosa*, *Klebsiella sp*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Vibrio*. Éstos taxones coinciden con lo que describe Nájera (2015) en su estudio sobre microbiota bacteriana nasal y cloacal de *Lepidochelys olivacea* en los Cóbano, Sonsonate, El Salvador.

De los datos registrados, un total de cinco taxones bacterianos identificados en ésta investigación fueron encontrados en común por Keene *et al.*, (2014) en su estudio de aislamientos microbianos de nidos de *Lepidochelys olivacea* y *Chelonia mydas agassizii* en el Pacífico de Costa Rica. Éstos taxones bacterianos, en la cavidad cloacal son: *Enterobacter sp.*, *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus epidermis*, *Citrobacter freundii* y *Citrobacter sp.*

De manera similar, algunos de los géneros bacterianos en común identificados en éste estudio fueron encontrados por Alduina *et al.*, (2020) en su investigación sobre la microbiota oral en la tortuga marina *Caretta caretta* en el Mar Mediterráneo. Éstos géneros en la cavidad oral son: *Escherichia*, *Citrobacter*, *Pseudomonas* y *Klebsiella*.

Se ha determinado que muchas especies de fauna silvestre poseen un potencial zoonótico, es decir, que causan enfermedades tanto al ser humano como a la fauna doméstica. Debido a esto es importante conocer cuáles de las especies de bacterias identificadas en tortugas marinas pueden representar un riesgo para la salud, principalmente para investigadores como para el personal de los campamentos tortugueros. En este estudio, algunos de los taxones de bacterias identificados como *Staphylococcus*, *Vibrio*, *E. coli*, *Salmonella sp.*, *Streptococcus* y otras enterobacterias, son causantes de enfermedades zoonóticas, tal y como lo menciona Santoro *et al.*, (2003). Por lo tanto, esto podría desencadenar una zoonosis por el consumo de huevos y carne que muchos pobladores locales aún realizan, así como por la manipulación de las tortugas con fines de conservación en los campamentos.

De los taxones identificados en el Santuario Playa Puerto Arista, que son patógenos, se encontraron en ambas cavidades: *Pseudomona aeruginosa* y *Citrobacter sp.*, éstas bacterias pueden portarse como oportunistas, debido a que aprovechan las condiciones de estrés, causando enfermedades graves, al ingresar en los tejidos dañados por traumas (Glazebrook y Campbell, 1990).

Las enfermedades causadas por la infección bacteriana de *Vibrio alginolyticus*, son conocidas como: estomatitis ulcerativa, rinitis obstructiva y bronconeumonía, las cuales causaron altas tasas de mortalidad del 70% en ejemplares juveniles de

tortugas: *Caretta caretta* y *Chelonia mydas* mantenidas en cautiverio de acuerdo a lo descrito por Glazebrook y Campbell (1993).

En hembras anidantes del Santuario Playa Puerto Arista, el grupo que más predominó fue el del grupo de las bacterias Gram negativas, de las cuales se identificaron 16 taxones y dos del grupo de Gram positivos. Estos datos son similares a lo que se ha encontrado en otros estudios de tortugas marinas del género *Lepidochelys*, reportado por Serrano *et al.*, (2012) en su estudio de Flora bacteriana en la tortuga *L. kempii* en Veracruz, México. En total obtuvo 14 especies de bacterias, de las cuales 10 fueron Gram negativas y cuatro Gram positivas.

En cuanto a otros trabajos, se ha encontrado que el género de bacterias Gram negativas fue dominante, esto fue reportado por Orós *et al.*,(2005) en su investigación sobre enfermedades y causas de mortalidad en tortugas marinas varadas: *Caretta caretta*, *Chelonia mydas* y *Dermochelys coriacea* en las Islas Canarias, España. En total identificaron 14 taxones de bacterias aisladas, de las cuales 10 fueron del grupo de Gram negativas y cuatro Gram positivas.

Aunque en éste estudio no se determinó la microbiota nasal, en otros trabajos se han identificado bacterias de ésta cavidad en hembras anidantes de *L. olivacea*. Santoro *et al.*, (2006) realizaron estudios en la cavidad nasal y cloacal, y los aislamientos Grampositivos predominaron, compuestos por especies de *Staphylococcus*, que constituían el 73.2 % de todos los microorganismos Grampositivos. De los aislamientos Gramnegativos, el 53.1% de ellos pertenecían a la familia *Enterobacteriaceae*, incluidos los géneros *Enterobacter sp.*, *Escherichia sp.*, *Klebsiella sp.* y *Serratia sp.* Con respecto a esto, Santoro *et al.*, (2008) realizaron otro estudio para identificar la microbiota nasal y de la cloaca en hembras anidantes de *Dermochelys coriacea*, y reportaron que una porción predominante de los aislamientos Gramnegativos (60/113) pertenecían a la familia *Enterobacteriaceae*. Los aislamientos incluyeron especies de los géneros *Enterobacter sp.*, *Escherichia sp.*, *Klebsiella sp.*, *Proteus sp.*, y *Salmonella sp.*, contrariamente al perfil Grampositivo propuesto para *L. olivacea*. Mientras que *Bacillus sp.* (Gram positivo) era más prominente en la cavidad nasal,



ya que el 96.3% procedían de las muestras nasales. Por otro lado, Zavala-Norzagaray *et al.*, (2015) realizaron un estudio de cultivos para *Vibrio spp.* resistentes a los antibióticos, en donde determinaron la microbiota de la nasofaringe y la cloaca de las tortugas verde y golfina. Se identificaron bacterias Gramnegativas dentro de la familia *Enterobacteriaceae*, incluidas especies de los géneros *Citrobacter sp.*, *Escherichia sp.*, *Edwardsiella sp.*, *Morganella*, *Proteus sp.* y *Providencia sp.*, mientras que en la cavidad cloacal se identificaron: *Citrobacter freundii*, *E. coli*, *Morganella*, *Proteus providencia* y *Vibrio fluvialis*, en éste estudio reportaron que es complicado determinar la microbiota bacteriana en ambas cavidades, esto se debe a que cada mucosa presenta una microbiota única. Es evidente que estos estudios demuestran que es necesario separar cada cavidad anatómica durante los análisis, para obtener una comprensión más precisa de la microbiota central en cada sitio a analizar, lo cual permitirá tener un conocimiento más amplio y preciso en cada cavidad anatómica a estudiar en las tortugas marinas.

De acuerdo al objetivo planteado en ésta investigación, se esperaba determinar el efecto de las tallas en hembras anidantes sobre la riqueza taxonómica de bacterias en la cavidad bucal y cloacal de *L. olivacea*. En éste estudio se realizó un análisis de correlación para evaluar la relación entre la morfometría de las tortugas y la riqueza bacteriana, en donde el valor de coeficiente más alto se obtuvo en relación con la riqueza del Ancho Curvo del Caparazón (ACC) la cual resultó significativa, por el contrario, en la relación de riqueza con el Largo Curvo del Caparazón (LCC) la relación fue baja y ésta no resultó significativa. En cuanto a otros estudios, se ha encontrado que la presencia de agentes bacterianos en las tortugas marinas no se relaciona con su talla, esto fue reportado por Reséndiz y Fernández (2021) en su estudio de Identificación bioquímica de bacterias en *Chelonia mydas* del Pacífico mexicano, realizaron una prueba estadística que no mostró diferencias significativas entre la presencia de los diferentes microorganismos y el LCC de las tortugas, lo cual indicó que las bacterias encontradas se presentaron indistintamente en ejemplares juvenil y adultos.

Aparte de la variabilidad entre la riqueza bacteriana y la morfometría de LCC y ACC, relacionada con la talla en tortugas marinas, el ambiente también influye en la composición de la microbiota bacteriana en estos animales de vida silvestre, con respecto a lo que reporta Acuña *et al.* (2000) en su estudio sobre fuentes de contaminación por *Vibrio mimicus* en huevos de tortuga, reportaron que el nivel de carga microbiana de la arena en playas de anidación, presenta una variabilidad constante por los efectos climáticos, las mareas, y sobre todo excavaciones de animales, así como la concentración de materia orgánica en la arena. Por lo cual, se han realizado investigaciones como la que reporta Serrano *et al.*, (2012) en nidos y crías (cabeza, caparazón y aletas) de tortugas marinas, quienes tomaron muestras bacteriológicas en los nidos, identificando 11 especies bacterianas: *A. hydrophila*, *Bacillus sp.*, *Edward-siella sp.*, *Enterobacter sp.*, *E.coli*, *Mycobacterium sp.*, *Proteus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Salmonella sp.*, *Staphylococcus sp.* y *V. alginolyticus*, mientras que en las crías solo se identificaron siete: *Edwardsiella sp.*, *Enterobacter sp.*, *E. coli*, *Pseudomonas sp.*, *Salmonella sp.*, *Staphylococcus sp.* y *V. alginolyticus*. Por otro lado, Raidal *et al.*, (1998) realizaron un estudio sobre infecciones bacterianas y parasitismo en tortugas marinas y reportaron que *Salmonella sp.* se ha encontrado en un 94% de todas las especies de quelonios estudiados con ese fin, y ha estado presente en las heces, fosas nasales, oculares y cloacas de las ocho especies de tortugas marinas como flora normal saprófita, mencionándose que estas bacterias afectan el 90% de los ejemplares juveniles y crías de tortugas, así como en el 18-24% de los adultos.

Hasta nuestro conocimiento, el trabajo mostrado aquí es el primer estudio sobre microbiota bacteriana en *L. olivacea* en Chiapas, por lo que como perspectiva se plantea profundizar el estudio, por ejemplo, determinando el perfil de susceptibilidad antibacteriana en las bacterias aisladas, así como detectar ciertos marcadores de virulencia entre dichos microorganismos. Estos datos aportarían un perfil de patogenicidad de las bacterias que portan *L olivacea* y su probable impacto en elementos del ecosistema del santuario Playa Puerto Arista.

## XI. CONCLUSIONES

La microbiota bacteriana de hembras anidantes de *L. olivacea* está compuesta por 18 taxones.

La cavidad bucal presentó una mayor riqueza con 17 de taxones, de los cuales cinco se identificaron solo a nivel de género.

En la cavidad cloacal se obtuvo una menor riqueza, con un total de seis taxones bacterianos, de los cuales dos se identificaron a género y cuatro a nivel de especie.

Los taxones bacterianos más frecuentemente identificados en la cavidad bucal fueron el género *Enterobacter*, con una frecuencia relativa de 34.8%, y el género *Streptococcus* en un 8.7%.

En la cavidad cloacal el género *Enterobacter* fue el de mayor frecuencia relativa (61.5%), seguido del género *Streptococcus* (15.4%).

El grupo de bacterias Gramnegativas presentó mayor frecuencia relativa en la cavidad bucal en un 60% y el 40% en la cavidad cloacal.

El grupo de las bacterias Grampositivas presentó mayor frecuencia relativa en la cavidad cloacal en un 4.57% y en la cavidad bucal en un 3.43%.

Existe un efecto del Ancho Curvo del Caparazón (ACC) sobre la riqueza microbiana de hembras anidantes de tortuga golfina.

## **XII. RECOMENDACIONES.**

- Ampliar éste tipo de estudios a otras playas de anidación en el Pacífico mexicano y en series amplias de tiempo.
- Comparar la carga bacteriana de las tortugas con la del medio ambiente; agua marina y arena de los nidos naturales.
- Realizar un estudio molecular para mayor precisión en la identificación de los taxones bacterianos.
- Comparar la microbiota bacteriana con otras especies de tortugas para determinar cuál es la microbiota natural de la tortuga golfina.
- Determinar la microbiota bacteriana en otras cavidades: nasal, ocular, caparazón y aletas en hembras anidantes de tortuga golfina para conocer los taxones que colonizan a esta especie.
- Realizar un análisis de perfil de susceptibilidad antimicrobiana.
- Replicar éste estudio con un mayor número de muestras bacteriológicas.

### **XIII. REFERENCIAS.**

Acuña, M. T., Díaz, G. Bolaños, H. Barquero, C. Sánchez, O. Sánchez, L. M. Mora, G. Chaves, A. & Campos, E. 2000. Sources of *Vibrio mimicus* contamination of turtle eggs. American Society for Microbiology 65: 336-338.

Ahasan, M.S., Waltzek, T.B., Huerlimann, R., Ariel, E. 2018. Comparative analysis of gut bacterial communities of green turtles (*Chelonia mydas*) pre-hospitalization and postrehabilitation by high-throughput sequencing of bacterial 16S rRNA gene. Microbiology Research. 207:91-99. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.11.010>.

Alduina, R. Gambino, D., Presentato, A., Gentile, A., Sucato, A., Savoca, D., *et al.* 2020. Is *Caretta Caretta* a carrier of antibiotic resistance in the Mediterranean Sea? Antibiotics. 9:116.

Arroyo, E. 2019. Caracterización socioecológica y análisis de actores del santuario Playa Puerto Arista, Chiapas, México: Una aproximación desde la recuperación de las perspectivas locales. Tesis de maestría. Instituto de Ciencias Biológicas. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Tuxtla, Guitierrez, Chiapas, México.

Bolten, A. 2003. Variation in sea turtle life history patterns: neritic vs. oceanic developmental stages, in The Biology of Sea Turtles Vol. II, (Boca Raton, FL: CRC Press), 243–257.

Bolongaro, C. R., Márquez, G. V. y Rodríguez, A.V. 2010. Vulnerabilidad de las zonas costeras mexicanas ante el cambio climático. SEMARNAT- INE. UNAM ICMYL. Universidad Autónoma de Campeche. México. 514 p.

Breedlove D. E. 1981. Flora de Chiapas. Managing. The California Academy of Sciences Golden Gate Park. San Francisco, California, USA. Pp. 01-05.

Briseño- Dueñas, R. 1980. Aspectos biológicos y protección de la Tortuga Golfina *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz), en la plata El Verde, Sinaloa (Temporadas 1975 - 1977). Instituto Politécnico Nacional (IPN). México. 54.

Brooks, G.F.; Carroll, K.C.; Butel, J.S.; Morse, S.A.; Mietzner, T.A. 2011. Microbiología Medica, McGRAW-HILL 25ª edición 833 pp.

Cardenas, A., Corral, R., Garza, F., Arriaga, V., López, L., Olvera, R., Del Valle, J. y Martínez, V. 2006. Informe de Evaluación Estatal. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Chiapas, Mexico. Pp. 09-13.

Chacón, D., Sánchez, J. Calvo, J.J. y Ash, J. 2004. La tortuga Carey del Caribe Introducción a su biología y estado de conservación. WWF-Programa Regional para América Latina y el Caribe, San José, Costa Rica. 74 pp.

Choi, Ga-Young y Eckert, Karen L. 2009. Manual de Mejores Prácticas para la Protección de Playas de Anidación de Tortugas Marinas. Red de Conservación de Tortugas Marinas en el Gran Caribe (WIDECAST). Informe Técnico No. 9. Ballwin, Missouri. 96 pp.

Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas. 2012. Sistema Estuarino Puerto Arista. Directrices de conservación y manejo. RAMSAR. Comisión Nacional de Áreas.

Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas. 2014. Estudio Previo Justificativo para la Ampliación del polígono del Santuario playa puerto arista, Tonalá, Chiapas.

Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas, 2018. Informe de temporada 2016-2018 de tortuga marina para Santuarios y Campamentos Tortugueros. CONABIO. Manglares de México: Extensión y distribución. 2ª ed. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. 99 pp.

Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas. 2023. <https://simec.conanp.gob.mx/ficha.php?anp=162&reg=8>

Collins, C.H.; Lyne, P.M.; Grange, J. M.; Falkinham, J. O. III, 2004. Microbiological Methods, Eighth Edition. *Arnold*. 456 pp. London.

Eckert, K. L., Bjorndal, K. A., Abreu-Grobois, F. A., y Donnelly, M. 2000. Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las Tortugas Marinas. Grupo especialista en Tortugas Marinas. Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y Comisión de Supervivencia de Especies, Publicación. (4), 270 p. Pennsylvania USA.

Fernández, A. De la Fuente, C. Saéz, J. Valdezate, S. 2010. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.

Filek, K. Trotta, A. Gračan, R. Di Bello, A. Corrente, M. Bosak, S. 2021. Characterization of oral and cloacal microbial communities of wild and rehabilitated loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). *Anim Microbiome*. 3;3(1):59. DOI: 10.1186/s42523-021-00120-5. PMID: 34479653; PMCID: PMC8417999.

García, A., Ceballos, G. y Adaya, R. 2003. Intensive beach management as an improved sea turtle conservation strategy in Mexico. *Biological Conservation*. 111:253- 261.

García, L. 2011 Principales amenazas para las tortugas marinas. Disponible en red: <http://www.playasandiegoelsalvador.com/la-tortuga-golfina>.

Glazebrook, J.S. y R.S.F. Campbell.1990. A survey of the diseases of marine turtles in northern Australia.II.Oceanarium-reared and wild turtles.*Dis. Aquat. Org.* 9: 97-104. Consultado: 07-04 de 2011.

Hasbún, C. R. y Vásquez, M. 1995. Proyecto de conservación de la tortuga marina en Barra de Santiago, El Salvador, 1994. Asociación Ambientalista Amigos del Árbol (AMAR). El Salvador.

Hammer, Ø. Harper, D.A.T., Ryan, P.D. 2001. Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Paleontología Electronica* 4 (1): 9 pp.

Keene E, Soule T, Paladino F. 2014. Microbial isolations from Olive Ridley (*Lepidochelys olivacea*) and East Pacific Green (*Chelonia mydas agassizii*) Sea Turtle Nests in Pacific Costa Rica, and testing of cloacal fluid antimicrobial properties. *Chelonian Conserv Biol.* 13:49–55.

Lawrence, K. y Needham, J.R. 1985. Rhinitis in long term captive Mediterranean tortoises (*Testudo graeca* and *Testudo hermanni*). *Vet. Rec.* 21: 662-664.

López-Castro, J. J., A. M. Aburto-Oropeza, M. A. Vásquez-Botello, J. J. Arcos-Huitrón, y J. A. Pérez-Jiménez. 2004. Distribución y abundancia de tortugas marinas en el Pacífico mexicano. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 39(2): 205-219.

Madigan, M.T; Martinko, J.M.; Parker, J. 2003. *Biología de los microorganismos*. 10ª Edición, 1096 pp.

Magdaleno-Ramírez, J. 2000. Ficha Informativa de los Humedales de Ramsar. Instituto de Historia Natural y Ecología. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.

Márquez-M. R., Villanueva, A. y C. Peñaflores. 1976. Sinopsis de datos biológicos sobre la Tortuga Golfina (*Lepidochelys olivacea*) (Eschscholtz, 1829). FAO-INP Sinopsis sobre la pesca. (2):1-67

Márquez, M., A. M. Aburto-Oropeza, y J. J. López-Castro. 1989. Mortalidad de huevos de tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*) en playas de Nayarit, México. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 34(2): 129-141.

Márquez, M. R. 1996. Las tortugas marinas y nuestro tiempo. *Ciencia/ 144*. SEP CONACYT. Fondo de Cultura Económica. México. 186.

Márquez, R., y del Carmen Farías, M. 2000. Las tortugas marinas y nuestro tiempo. Fondo de cultura económica. México. 186 p.

Márquez, R. 2002. Las tortugas marinas y nuestros tiempos. *La Ciencia para Todos*. Fondo de Cultura Económica. México. 199 p.



Mejía-Ruíz, J.E. 2020. Caracterización de la playa Puerto Arista, Chiapas y la anidación de la tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*) durante el periodo 2014-2015. Tesis de licenciatura. Instituto de Ciencias Biológicas. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.

Nájera Abarca, S. y Salinas Guzmán, A. 2015. Determinación de la Flora Bacteriana Nasal y Cloacal de la Tortuga “golfina” *Lepidochelys olivacea*, Especie Anidante en el Área Natural Protegida Complejo Los Cóbanos. Sonsonate, El Salvador. Tesis de Universidad de el Salvador. San Salvador.

Orós, J., A. Torrent, P. Calabuig & Déniz, S. 2005. Diseases and causes of mortality among sea turtles stranded in the Canary Islands, Spain (1998-2001). *Diseases of Aquatic Organisms* 63: 13-24.

Preseatt, M, John P. Harley y Donald A. Klein. 2004. Microbiología Mcgraw-Hillinteramericana de españa, S. A.

Pace, A., Rinaldi, L., Ianniello, D. *et al.* 2019. Investigación gastrointestinal de parásitos y *Enterobacteriaceae* en tortugas bobas de costas italianas. *BMC Vet Res* 15, 370 (2019). <https://doi.org/10.1186/s12917-019-2113-4>.

Raidal, S. Ojara, R., M. Hobbs, R. P. & Prince, R. 1998. Gram-negative bacterial infections and cardiovascular parasitism in green sea turtles (*Chelonia mydas*). *Australian Veterinary Journal* 76: 415-417.

Ramírez, L., Gómez, J., y Gómez, M. 2018. Variación espacial de la dinámica costera en la playa de Puerto Arista, Chiapas, México. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas*, 35(2), 357-371.

Reséndiz, E. Fernández-Sanz, H. & Lara-Uc, M. 2018 Baseline health indicators of Eastern Pacific Green Turtles (*Chelonia mydas*) from Baja California Sur, Mexico. *Comparative Clinical Pathology* 27(5):1309–1320.

Reséndiz, E. Fernández-Sanz, H. 2021. Identificación bioquímica de bacterias potencialmente patógenas y zoonóticas en las tortugas negras (*Chelonia mydas*) del Pacífico Mexicano. *Abanico veterinario*. 11:1-13.

Rodríguez, P. y Arenas, R. 2018. Hans Christian Gram y su tinción. Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica. Vol. 16. Ciudad de México.

Sandoval, L. E. 2008. Tortugas marinas de México: historia, biología y conservación. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México.

Santoro, M. Orrego, C.M. y Hernández Gómez, G. 2003. Flora Bacteriana Cloacal y Nasal de *Lepidochelys olivacea* (Testudines: *Cheloniidae*) en el Pacífico Norte de Costa Rica. Disponible en red: <http://www.ots.ac.cr/tropiweb/attachments/volumes/vol54-1/05-SANTOROFlo.pdf>.

Santoro, M. Orrego, C.M. y Hernández Gómez, G. 2006. Flora Bacteriana Cloacal y Nasal de *Lepidochelys olivacea* (Testudines: *Cheloniidae*) en el Pacífico Norte de Costa Rica.

Seminoff, J. A., y Wallace, B. 2012. Assessing the conservation status of sea turtles in the Pacific Ocean. *Endangered Species Research* 17(1): 1-17.

Serrano A., L. Vázquez-Castán, C.G., Sánchez Silva, A.J. Basáñez-Muñoz y C. Naval-Ávila. 2012. Identificación de la flora bacteriana en la tortuga (*Lepidochelys kempii*) en el ejido Barra Galindo, Tuxpan, Veracruz, México. *Hidrobiológica* 22 (2): 142-146.

Snipes, K.P. Biberstein, E.L. y Fowler, M.E. 1980. A *Pasteurella* spp. Associated with respiratory disease in captive desертtortoises. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 177: 804-807.

Snover, M.L. 2002. Growth and ontogeny of sea turtles using skeletochronology: methods validation and application to conservation. Tesis Doctoral. Duke University, Durham, Carolina del Norte, E.U.A.

Tortora, G.J.; Funke, B.R.; Case, C.L. 2007. Introducción a la microbiología 9a ed. Medica Panamericana. 988 pp. Buenos Aires.

Vivaldo Gámez, S., García Márquez, L. J., Sarabia, D. O., Vázquez García, J. L., Casas, F. C. 2009. Patología de las tortugas marinas (*Lepidochelys olivacea*)

que arribaron a las playas de Cuyutlán, Colima, México. *Veterinaria México* 40: 69-78.

Zavala-Norzagaray, A.A. Aguirre, A.A. Velazquez-Roman, J. Flores-Villaseñor, H. León-Sicairos, N. Ley-Quiñonez, C.P. Hernández-Díaz, L.D.J. & Canizalez-Roman, A. 2015. Isolation, characterization, and antibiotic resistance of *Vibrio spp.* in sea turtles from Northwestern Mexico. *Frontiers in Microbiology* 6:635. doi: 10.3389/fmicb.2015.00635.

Zug, G.R., Chaloupka, M. y Balazs, G.H. 2006. Age and growth in Olive Ridley Sea Turtles (*Lepidochelys olivacea*) from the north-central Pacific: a skeletochronological analysis. *Marine Ecology*. 27:263-270.

## ANEXOS

### Trabajo de Campo.



Toma de medidas morfométricas del Largo Curvo del Caparazón (LCC) y Ancho Curvo del caparazón (LCC) en hembra anidante de *L. olivacea*.



Ilustración de la cavidad cloacal (flecha roja) de una hembra anidante de tortuga golfina.



Obtención de muestra biológica en la cavidad cloacal de hembra anidante de *L. olivacea*, mediante introducción del hisopo estéril y colocación en medio de transporte Stuart.



Obtención de muestra bacteriológica en la cavidad bucal, con ayuda de cordones para sujetar la boca de la tortuga, e introducción de hisopo estéril y colocado en medio Stuart.

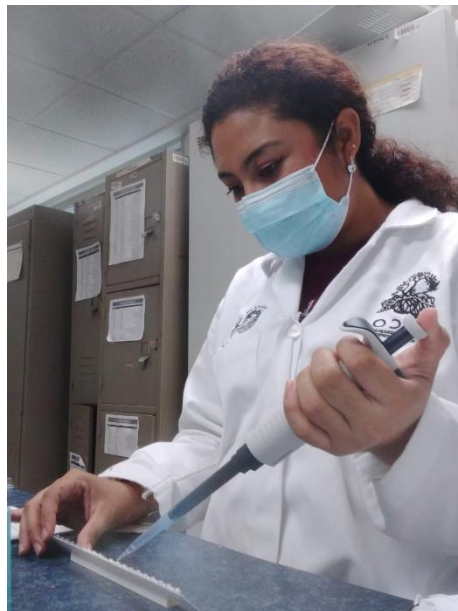


Apoyo en la recolecta de huevos a partir de nidos de tortuga golfina, en los monitoreos biológicos para la conservación de la especie por parte del campamento tortugero de la SEMAHN, Puerto Arista, Chiapas.

## Trabajo en laboratorio.



Siembra de bacterias aeróbicas en Agar TCBS y MacConkey, con la supervisión del Dr. Gutiérrez-Jiménez, en el Laboratorio de Biología Molecular y Genética de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas.



Siembra de suspensión bacteriana (colonia aislada disuelta en 5 mL de NaCl al 0.9%) en los tubos de galería de Api20E (Biomériux) con ayuda de una micropipeta de 1000  $\mu$ L.

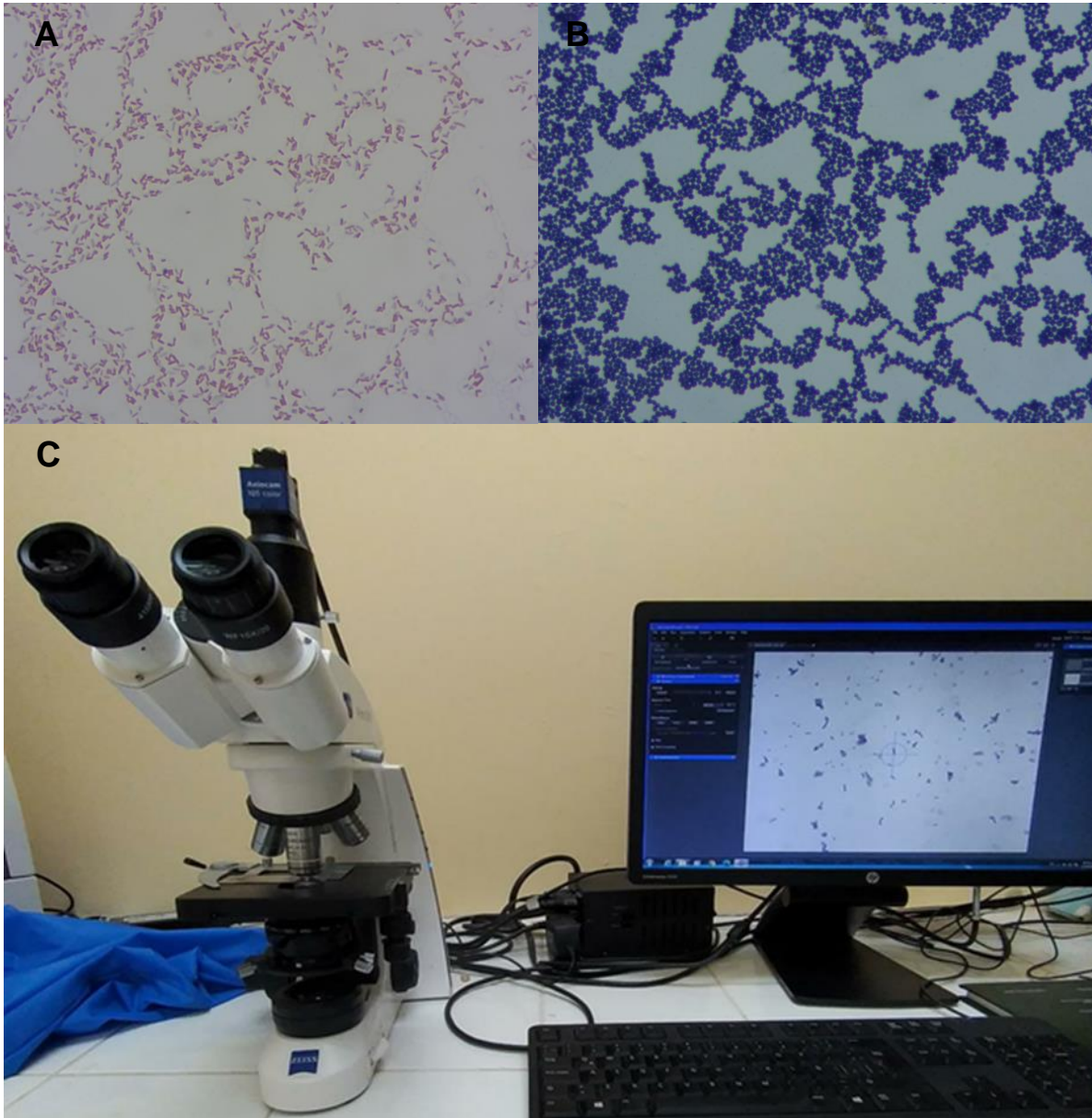




Siembra en medio Agar TCBS, colonias puntiformes, convexas, coloración verdes con borde entero.



Siembra en Agar MacConkey, colonias puntiformes, elevación convexas, coloración rosa con borde entero.



Análisis y observación de bacterias. A), Bacilos Gramnegativos; B), cocos Grampositivos; C) microscopio óptico con objetivo de inmersión (100x) y cámara Axiocam (Zeiss).



Otorga el presente

## RECONOCIMIENTO

A: **Elsy G. Lorenzana-Manuel, Emilio I. Romero-Berny, Javier Gutiérrez-Jiménez**

Por su conferencia:

**FLORA BACTERIANA EN HEMBRAS ANIDANTES DE TORTUGA GOLFINA EN EL SANTUARIO PLAYA DE PUERTO ARISTA, CHIAPAS, MÉXICO**

impartida en modalidad presentación oral en línea el miércoles 12 de septiembre de 2022.

Yautepec, Morelos a 16 de septiembre del 2022

  
Dr. Juan de Dios Valdez Leal  
COORDINADOR DE PRESENTACIONES LIBRES

  
Dra. Kalina Bermúdez Torres  
COORDINACIÓN GENERAL DEL XXV CONGRESO  
DE LA BIOLÓGICA Y LA CONSERVACIÓN DE LA BIOLÓGICA  
CONSEJO SABIC 0029106/2022



Difusión de los resultados en el XXV Congreso de la Sociedad Mesoamericana para la Biología y la Conservación y 3er Congreso de la Sociedad para la Biología de la Conservación, Sección Latinoamérica y El Caribe (SBC-LACA), celebrado en septiembre del año 2022, ponencia en modalidad virtual.