

Identificación de la flora bacteriana en la tortuga lora (*Lepidochelys kempii*) en el ejido Barra Galindo, Tuxpan, Veracruz, México

Identification of the bacterial flora in Kemp's Ridley sea turtle (*Lepidochelys kempii*) in Barra Galindo, Tuxpan, Veracruz, Mexico

Arturo Serrano,¹ Laura Vázquez-Castán,¹ Claudia G. Sánchez Silva,¹
Agustín de Jesús Basañez-Muñoz² y Celina Naval-Ávila¹

¹Laboratorio de Mamíferos Marinos, Universidad Veracruzana, Tuxpan, Veracruz, México, km 7.5 Carretera Tuxpan-Tampico, México

²Laboratorio de Preservación y Conservación de Ecosistemas, Universidad Veracruzana, km 7.5 Carretera Tuxpan-Tampico, Col. Universitaria, Tuxpan, Veracruz, 92850. México
e-mail: arserrano@uv.mx

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

RESUMEN

La tortuga lora (*Lepidochelys kempii*) es una especie considerada en peligro de extinción por las leyes mexicanas y por varios organismos internacionales. Una de las principales amenazas a la existencia de este quelonio, es su captura indiscriminada y la destrucción de sus nidos por parte de los seres humanos. Un peligro adicional son los agentes etiológicos virales, bacterianos o micóticos. El presente estudio se llevó a cabo en el área de conservación "Campamento tortuguero Ejido Barra Galindo", Tuxpan, Veracruz. Se tomaron muestras de hembras anidadoras, de crías y de los nidos. En total se obtuvieron 14 especies de bacterias, de las cuales 10 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*. Este tipo de estudios permitirá conocer el papel que juegan las bacterias patógenas en las enfermedades infecciosas de las tortugas marinas y cómo estas afectan la sobrevivencia de sus poblaciones en condiciones naturales.

Palabras clave: Flora bacteriana, Golfo de México, *Lepidochelys kempii*, tortuga lora, tortugas marinas.

ABSTRACT

Kemp's Ridley turtle (*Lepidochelys kempii*) is considered as critically endangered by Mexican laws and by several international organizations. One of the main dangers is the indiscriminate capture and destruction of nests by humans, and a second source of mortality are viral, as well as bacterial or fungal infections. This study took place in the conservation area "Campamento tortuguero Ejido Barra Galindo", Tuxpan, Veracruz. Samples were obtained from nesting females, hatchlings, and nests. In total 14 bacterial species were identified, 10 Gram negative and four Gram positive. The species identified were: *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* and *Vibrio alginolyticus*. The four more frequent were: *Edwardsiella* sp., *Escherichia*

coli, *Salmonella* sp. and *Vibrio alginolyticus*. This type of studies may allow an understanding of the role played by microorganisms in infectious diseases of marine turtles and how they may affect the survival of natural populations of these animals under natural conditions.

Key words: Bacterial flora, Gulf of Mexico, Kemp's Ridley turtle, *Lepidochelys kempii*, sea turtles.

INTRODUCCIÓN

La tortuga lora (*Lepidochelys kempii* Garman, 1880) es una especie considerada en peligro de extinción por las leyes mexicanas (SEMARNAT, 2010) y por varios organismos internacionales (IUCN, 2011; CITES, 2011). Una de las principales amenazas a su existencia es la captura indiscriminada y la destrucción de sus nidos por parte de los seres humanos (Eckert *et al.*, 2000). Existen otras causas que han mermado la población de la tortuga marina, como la pesca incidental por palangre o trasmallo y la destrucción de sus sitios de alimentación, descanso y anidación (Eckert *et al.*, 2000). Otra amenaza son las infecciones por agentes virales, bacterianos o micóticos, que actúan directa o indirectamente, desencadenando patologías graves (Ruiz *et al.*, 2000; Orós *et al.*, 2005; Gamez *et al.*, 2009; Sarmiento-Ramírez *et al.*, 2010).

El nivel de la contaminación microbiana de la arena de playas de anidación varía constantemente por efecto de factores climáticos, de las mareas, de las excavaciones de animales y de la concentración de materia orgánica, entre otros (Acuña *et al.*, 2000). Se ha sugerido que el aumento de la contaminación microbiana de la arena contribuye a la disminución de la viabilidad de los huevos, motivo por el cual es importante desarrollar estudios sobre patologías en tortugas y sus huevos.

Algunas patologías son procesos que ocurren de forma natural, ya que la calidad de vida en el hábitat de las tortugas marinas predispone al padecimiento de diversas enfermedades (Orós, 2004). Los estudios bacteriológicos en tortugas silvestres son importantes, puesto que permiten conocer el papel que juegan estos microorganismos en las enfermedades infecciosas y cómo afectan la sobrevivencia de las poblaciones de tortugas marinas en condiciones naturales (Santoro *et al.*, 2006). El objetivo del presente trabajo fue identificar algunas de las bacterias que se encuentran en hembras anidadoras de la especie *L. kempii* en las playas del ejido Barra Galindo, Tuxpan, Veracruz, México.

MATERIALES Y MÉTODOS

El área de conservación Barra Galindo se encuentra entre Tuxpan y Tamiahua, a 17 km del centro de Tuxpan. Se encuentra delimitada por las coordenadas (21°1'59.33" N - 21°9'13.49" N y 97°20'17.05" O y 97°23'38.88" O) y tiene una extensión de 12 km de playa. La temporada de anidación de *L. kempii* es de abril a octubre, por lo que se realizaron recorridos en estos meses para buscar hembras anidadoras de la tortuga lora, sus nidos y sus crías.

Toma de datos: Se recorrieron 12 km de costa en un horario de 11:00 a 16:00 hrs. Una vez encontrada la hembra se observó, con sumo cuidado de no ser visto por la tortuga, en qué actividad se encontraba (haciendo el nido, ovopositando o cubriendo el nido). Cuando la tortuga se encontró ovopositando se procedió a tomar las muestras.

Las muestras se trasladaron en una hielera al Laboratorio Médico Tuxpan (laboratorio clínico particular) en un periodo menor a 24 horas y se cultivaron en Agar Sangre en cajas petri a 34-37.5°C; los cultivos fueron revisados a las 24, 48 y 72 horas. Una vez obtenidas las colonias, se procedió a utilizar la técnica de tinción de Gram para identificar las diversas especies de bacterias con la guía de interpretación por colores para bacterias Gram – y Gram + en placas cronogénicas (catálogo 252631 CHROM agar Orientador) y con la ayuda de un microscopio óptico con objetivo de inmersión (100x).

La técnica de tinción de membranas consiste en teñir con tintes específicos diversas muestras de bacterias en un portaobjetos para saber si se han teñido o no con dicho tinte. Una vez adicionado los tintes específicos en las muestras y hecho el lavado la muestra fue limpiada con unas gotas de alcohol etílico para eliminar el tinte de las bacterias, y es aquí donde se reconocen las bacterias: si la bacteria conserva el tinte, es Gram positiva, y en el caso de que el tinte no se mantenga, es Gram negativa. Cada colonia de bacterias fue aislada en placas de agar y finalmente identificadas con pruebas bioquímicas rutinarias establecidas por Bisping y Amtsberg (1988). Algunos colonias fueron identificadas hasta género y otras hasta especie.

Muestras bacteriológicas en hembras: Se tomaron dos muestras superficiales, a cada hembra, una de ojos y la otra de la cloaca. En total se tomaron muestras de 57 hembras. Estas muestras se tomaron con la ayuda de hisopos estériles con medio de transporte Stuart, eligiéndose estos dos órganos, debido a que son conductos de secreción externa y eliminación corporal de la tortuga.

Muestras bacteriológicas en nidos: La muestra fue tomada cuando se notaba la presencia de líquido amniótico en la arena después del desove. Cuando no se observaron hembras anidando, se siguió el rastro hasta encontrar la cama y con ayuda de una vara se procedió a buscar el nido, introduciéndola y empujándola suavemente en toda la zona de la cama (es importante mencionar que la cama es una parte del nido). Esta técnica se realizó para no romper algún huevo dentro del nido.

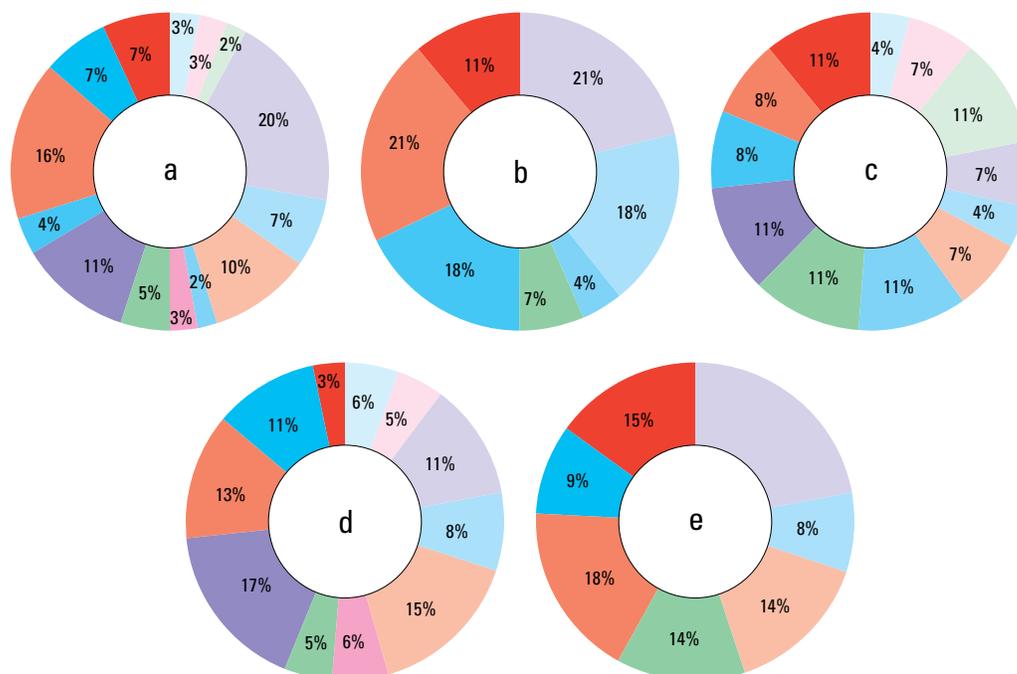


Figura 1. Porcentaje de frecuencia de bacterias, a) en organismos adultos (ojos y cloacas), nidos y crías. b) por muestra ocular. c) por muestra de cloaca. d) por muestra de nido. e) en crías.

■ *A. hydrophila*
 ■ *Bacillus* sp.
 ■ *Citrobacter* sp.
 ■ *E. coli*
 ■ *Edwardsiella* sp.
 ■ *Enterobacter* sp.
■ *Flavobacterium* sp.
 ■ *Mycobacterium* sp.
 ■ *Proteus* sp.
 ■ *Pseudomonas* sp.
 ■ *S. aureus*
■ *Salmonella* sp.
 ■ *Staphylococcus* sp.
 ■ *V. alginolyticus*.

Muestras bacteriológicas en crías: En el momento de la eclosión, las crías fueron frotadas con hisopos, en un número correspondiente al 10% del total de crías por nido. Las crías fueron elegidas al azar. El frote se hizo a través de toda la cría (cabeza, caparazón y aletas) para obtener muestras de las bacterias presentes sobre su cuerpo.

RESULTADOS

Para la toma de muestras, se realizó un total de 14 recorridos en la playa Barra Galindo en busca de hembras anidadoras. En total se obtuvieron 154 muestras entre hembras, crías y nidos, de las cuales se aislaron 14 cepas (10 Gram negativas y cuatro Gram positivas; Fig. 1a), cuatro de las cuales se identificaron a nivel de especie y las 10 restantes sólo a nivel de género.

Las cepas identificadas fueron las siguientes: *Aeromonas hydrophila* (Chester) Stainer, *Bacillus* sp., *Citrobacter* sp., *Edwardsiella* sp., *Enterobacter* sp., *Escherichia coli* Migula, *Flavobacterium* sp., *Mycobacterium* sp., *Proteus* sp., *Pseudomonas* sp., *Salmonella* sp., *Staphylococcus* sp., *S. aureus* Rosenbach y *Vibrio alginolyticus* (Miyamoto) Sakazaki.

Del total de cepas encontradas, siete se obtuvieron de las muestras oculares, 12 de las muestras cloacales, 11 de los nidos y

seis de las crías (Fig. 2): Las cuatro siguientes resultaron comunes a todos los tipos de muestra: *Edwardsiella* sp., *E. coli*, *Salmonella* sp. y *V. alginolyticus* (Fig. 1b-e).

Bacterias en muestras oculares: En estas muestras, se observaron *Edwardsiella* sp., *E. coli*, *Flavobacterium* sp., *Proteus* sp., *Salmonella* sp., *S. aureus* y *V. alginolyticus*. Entre estas, las que se observaron con mayor frecuencia fueron *Salmonella* sp. y *E. coli*, con un 21% cada una (Fig. 1b).

Muestras en cloacas: En las muestras analizadas se observaron *A. hydrophila*, *Bacillus* sp., *Citrobacter* sp., *Edwardsiella* sp., *Enterobacter* sp., *E. coli*, *Flavobacterium* sp., *Proteus* sp., *Pseudomonas* sp., *Salmonella* sp., *S. aureus* y *V. alginolyticus*, siendo las más frecuentes *Citrobacter* sp. y *Flavobacterium* sp. (Fig. 1c).

Bacterias en nidos: En las muestras obtenidas de los nidos se observaron las bacterias *A. hydrophila*, *Bacillus* sp., *Edwardsiella* sp., *Enterobacter* sp., *E. coli*, *Mycobacterium* sp., *Proteus* sp., *Pseudomonas* sp., *Salmonella* sp., *Staphylococcus* sp. y *V. alginolyticus*, siendo las más frecuentes *Pseudomonas* sp. con un 17% de repeticiones, seguida por *Enterobacter* sp. con 15% (Fig. 1d).

Bacterias en crías: En las muestras tomadas de las crías se observó a *Edwardsiella* sp., *Enterobacter* sp., *E. coli*, *Pseudo-*

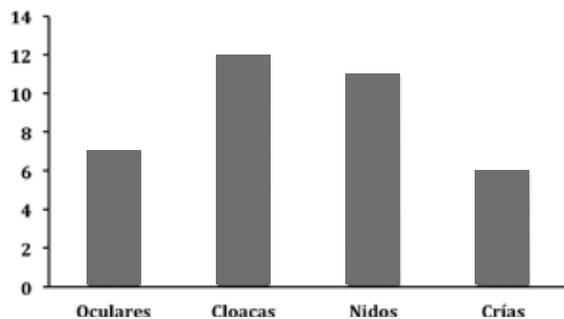


Figura 2a-e. Número de especies de bacterias por muestra encontradas en distintas partes del cuerpo de adultos y crías de tortuga lora (*Lepidochelys kempii*) y en nidos.

monas sp., *Salmonella* sp., *Staphylococcus* sp. y *V. alginolyticus*; siendo las más frecuentes *E. coli* y *Salmonella* sp. (Fig. 1e).

DISCUSIÓN

Los estudios de la flora bacteriana presente en poblaciones silvestres de tortugas marinas son de fundamental importancia, porque permiten evaluar la posible presencia de enfermedades infecciosas causadas por estos microorganismos, que pueden afectar la sobrevivencia de sus poblaciones en condiciones naturales.

Algunas de las bacterias identificadas en este estudio, como por ejemplo *E. coli* y *Salmonella* sp., son las causas principales de enfermedades o mortalidad de tortugas, ya que actúan directa o indirectamente, desencadenando patologías graves (Raidal *et al.*, 1998). De acuerdo a Ruiz *et al.* (2000), las bacterias causantes de mortandad de tortugas por afecciones pulmonares son *Staphylococcus*, *Vibrio* y *Aeromonas*, las cuales fueron encontradas en este estudio.

En este trabajo, se registraron 14 especies de bacterias, una menos de las 15 identificadas en *Lepidochelys olivacea* (Fitzinger, 1843) por Santoro *et al.* (2006), en el cual, se analizaron 45 organismos en las costas del Pacífico al norte de Costa Rica. Las características de las playas de anidación de las especies de tortugas podrían ser un factor que influyó en esta leve diferencia. La playa Nancite (provincia de Guanacaste, Costa Rica), presenta una gran afluencia turística, que podría traer como consecuencia una elevada contaminación de la playa, la cual contribuiría a la abundancia de agentes patógenos que podrían afectar la salud de las tortugas marinas. Por el contrario, el área de estudio del presente trabajo (playa Barra Galindo, Veracruz) no es un sitio turístico. Además, es un área de conservación donde se promueven acciones encaminadas a la conservación, protección y rescate de la tortuga marina, por tanto no presenta alteraciones antrópicas.

Se ha observado que la mortalidad de organismos de la especie *Chelonia mydas* (Linnaeus 1758), se asocia en la mayoría de las veces a la acción de bacterias como *Vibrio alginolyticus*, *Aeromonas hydrophila* y *Pseudomonas* sp., ya que originan en muchos de los casos procesos sépticos (Ruiz *et al.*, 2000), siendo las lesiones primarias cutáneas una puerta de entrada para estos microorganismos, que se diseminan a otros órganos. Las lesiones cutáneas tienen un origen traumático (mordedura, redes o aparejos de pesca) en casi todos los casos (Ruiz *et al.*, 2000). En este trabajo, se encontró que estas mismas bacterias estuvieron presentes en las secreciones corporales de tortugas *L. kempii*, y por ende existe la posibilidad de que estas bacterias puedan generar condiciones patológicas en las tortugas, dependiendo del estado de estrés y otras patologías presentes en el organismo (Dickinson *et al.*, 2001). Por otra parte *Salmonella* sp. se ha encontrado en un 94% de todas las especies de quelonios, ofidios y saurios 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 jóvenes y crías de tortugas y el 18-24% de adultos (Raidal *et al.*, 1998). En el presente estudio fue detectada la presencia de *Salmonella* sp., aunque no se observaron individuos con heridas. Esto indica que la colonización por esta bacteria no sólo se da a través de las heridas cutáneas, sino que las hembras se deben infectar de otra forma.

Actualmente las ocho especies de tortugas marinas se encuentran en peligro de extinción por diversos factores como la pesca incidental, caza y destrucción de hábitat, entre otros (Eckert *et al.*, 2000). La capacidad de respuesta de estos animales frente a la exposición a un agente infeccioso o trauma físico está modulada por el estrés ambiental (Pereira-Zamora *et al.*, 2007).

Durante las últimas décadas, ha habido un número creciente de informes de enfermedades en tortugas marinas. Además, en los últimos años, se han documentado casos de enfermedades que aparentemente están surgiendo en estas especies, donde la etiología y/o patogénesis siguen siendo desconocidas. Estos casos presentan un riesgo para la sobrevivencia de las tortugas marinas, y por tanto para la salud y la estabilidad de los ambientes marinos bentónicos en los que ellas viven (Flint *et al.*, 2009). Por lo anterior se evidencia la necesidad de realizar nuevos estudios en los que se evalúen los efectos que tienen las bacterias encontradas en este estudio, sobre las poblaciones de tortugas lora en México.

AGRADECIMIENTOS

Estamos inmensamente agradecidos a los revisores del manuscrito y en especial al Dr. Domenico Voltolina por sus valiosos comentarios que ayudaron indiscutiblemente a mejorarlo. Agradecemos el apoyo del Laboratorio Médico Tuxpan, que facilitó sus

instalaciones y equipo de investigación, parcialmente patrocinados por el Laboratorio de Mamíferos Marinos de la Universidad Veracruzana Campus Tuxpan, Veracruz.

REFERENCIAS

- ACUÑA, M. T., G. DÍAZ, H. BOLAÑOS, C. BARQUERO, O. SÁNCHEZ, L. M. SÁNCHEZ, G. MORA, A. CHAVES & E. CAMPOS. 2000. Sources of *Vibrio mimicus* contamination of turtle eggs. *American Society for Microbiology* 65: 336-338.
- BISPING, W. & G. AMTSBERG. 1988. *Colour Atlas for the diagnosis of bacterial pathogens in animals*. Paul Parey Scientific Publishers (Ed.). Berlin and Hamburg. 339 p.
- CITES. (*Convention on international Trade in Endangered species of wild fauna and flora*). 2011. Appendices I, II, III. 47 p.
- DICKINSON, V. M., T. DUCK, C. R. SCHWALBE, J. L. JARCHOW & M. H. TRUEBLOOD. 2001. Nasal and cloacal bacteria in free-ranging desert tortoises from the western United States. *Journal of Wildlife Diseases* 37: 252-257.
- ECKERT, K. L., K. A. BJORNALD, F. A. ABREU-GROBOIS & M. DONNELLY. 2000. *Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las Tortugas Marinas*. Grupo Especialista en Tortugas Marinas. UICN/CSE Publicación No. 4. 270 p.
- FLINT, M., J. C. PATTERSON-KANE, C. J. LIMPUS, T. M. WORK, D. BLAIR & P. C. MILLS. 2009. postmortem diagnostic investigation of disease in free-ranging marine turtle populations: a review of common pathologic findings and protocols. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 21: 733-759.
- GÁMEZ VALDALO, S., L. J. GARCÍA MÁRQUEZ, D. O. SARABIA, J. L. VÁZQUEZ GARCÍA, & F. C. CASAS. 2009. Patología de las tortugas marinas (*Lepidochelys olivacea*) que arribaron a las playas de Cuyutlán, Colima, México. *Veterinaria México* 40: 69-78.
- IUCN (International Union for conservation of Nature and Natural Resources). 2011. *The IUCN Red list of Threatened species*. Version 2011.1. Available on line www.iucnredlist.org (downloaded August 2011).
- ORÓS, J. 2004. *Anatomía patológica de reptiles*. Universidad de las Palmas de Gran Canaria, Facultad de Veterinaria, Unidad de Histología y Anatomía Patológica. Disponible online en: <http://www.webs.ulpgc.es/apreptil/> (consultado el 19 noviembre 2011).
- ORÓS, J., A. TORRENT, P. CALABUIG & S. DÉNIZ. 2005. Diseases and causes of mortality among sea turtles stranded in the Canary Islands, Spain (1998-2001). *Diseases of Aquatic Organisms* 63: 13-24.
- PEREIRA-ZAMORA, M., F. HERNÁNDEZ-CHAVARRÍA & E. WONG-GONZÁLEZ. 2007. Penetración de *Vibrio mimicus* a través de la cáscara del huevo de tortuga lora (*Lepidochelys olivacea*). *Universidad de Costa Rica, Agronomía Mesoamericana* 18: 247-254.
- RAIDAL, S. R., M. OJARA, R. P. HOBBS & R. PRINCE. 1998. Gram-negative bacterial infections and cardiovascular parasitism in green sea turtles (*Cheloniemydas*). *Australian Veterinary Journal* 76: 415-417.
- RUIZ, A., A. TORRENT, J. ORÓS, M. CALABUIG-PASCUAL & S. DÉNIZ. 2000. Patologías y causas de mortalidad en tortugas marinas durante 1998 y 1999. Consejería de medio ambiente y Ordenación Territorial del Gobierno de Canarias. *Revista de Medio Ambiente* 16. Disponible en línea en: <http://www.gobcan.es/cmoyot/medioambiente/centrodokumentacion/publicaciones/revista/2000/16/225/> (consultado el 15 diciembre 2011).
- SANTORO, M., C. M. ORREGO & G. H. GÓMEZ. 2006. Flora bacteriana cloacal y nasal de *Lepidochelys olivacea* (Testudines: Cheloniidae) en el Pacífico Norte de Costa Rica. *Revista de Biología Tropical* 54: 43-48
- SARMIENTO-RAMÍREZ, J. M., E. ABELLA, M. P. MARTÍN, M. T. TELLERÍA, J. L. F. LÓPEZ, A. MARCO & J. D. URIBEONDO. 2010. *Fusarium solani* is responsible for mass mortalities in nests of loggerhead sea turtle, *Caretta caretta*, in Boavista, Cape Verde. *FEMS Microbiology Letters* 312: 192-200.
- SEMARNAT (Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales). 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059.SEMARNAT-2010. *Protección Ambiental-Especies Nativas de México de Flora y Fauna Silvestre-Categorías de Riesgo y Especificaciones para su Inclusión, Exclusión o Cambio- Lista de especies en riesgo*. Diario Oficial de la Federación. México, D. F. Diciembre 110: 1-78.

Recibido: 5 de septiembre de 2011.

Aceptado: 3 de julio de 2012.