

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA
ESCUELA DE BIOLOGÍA



TRABAJO DE GRADUACIÓN TITULADO:

Determinación de la Flora Bacteriana Nasal y Cloacal de la Tortuga “golfina”
Lepidochelys olivacea, Especie Anidante en el Área Natural Protegida Complejo
Los Cóbano. Sonsonate, El Salvador.

TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR:

SILVIA MERCEDES NÁJERA ABARCA
ANA MARÍA SALINAS GUZMÁN

PARA OPTAR AL GRADO DE:
LICENCIADA EN BIOLOGÍA

CIUDAD UNIVERSITARIA, FEBRERO DE 2015.

AUTORIDADES UNIVERSITARIAS

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR
INGENIERO MARIO ROBERTO NIETO LOVO

VICERRECTORA ACADÉMICA
MSC. ANA MARÍA GLOWER DE ALVARADO

VICERECTOR ADMINISTRATIVO
MAE. OSCAR NOÉ NAVARRETE

SECRETARIA GENERAL
DRA. ANA LETICIA ZAVALA DE AMAYA

FISCAL GENERAL
LIC. FRANCISCO CRUZ LETONA

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

DECANO
M.SC. MARTIN ENRIQUE GUERRA CÁCERES

VICEDECANO
LIC. RAMÓN ARÍSTIDES PAZ SÁNCHEZ

SECRETARIO
LIC. CARLOS ANTONIO QUINTANILLA APARICIO

DIRECTOR ESCUELA DE BIOLOGÍA
RODOLFO MENJIVAR.

SAN SALVADOR, FEBRERO DE 2015.

Índice

CONTENIDO	N° de Pág.
Índice	iii
Índice de Cuadros.....	v
Índice de Figuras.....	vi
RESUMEN	vii
1 INTRODUCCIÓN	1
2. FUNDAMENTO TEORICO	3
2.1 Características generales de las tortugas marinas.	3
2.2 Características de <i>Lepidochelys olivacea</i>	3
2.3 Amenazas para su supervivencia	4
2.4 Microorganismos en tortugas marinas	5
2.5 Familias bacterianas	7
2.5.1 Familia Aeromonadaceae.....	7
2.5.2 Familia Enterobacteriaceae.....	7
2.5.3 Familia Flavobacteriaceae.....	9
2.5.4 Familia Neisseriaceae	10
2.5.5 Familia Pasteurellaceae	10
2.5.6 Familia Pseudomonadaceae	11
2.5.7 Familia Staphylococcaceae.....	12
2.5.8 Familia Streptococcaceae	12
2.5.9 Familia Vibrionaceae	13
2.5.10 Familia Xanthomonadaceae.....	14
3 OBJETIVOS.....	15
3.1 Objetivo general.....	15
3.2 Objetivos específicos	15

4	MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
4.1	Ubicación Geográfica.....	16
4.2	Localización y descripción de los sitios de muestreo.....	17
4.3	Metodología de Campo.....	19
4.3.1	Colecta de la muestra.....	20
4.3.2	Conservación y transporte de la muestra.....	20
4.3.3	Caracterización de la tortuga.....	20
4.4	Metodología de Laboratorio.....	21
4.5	Análisis Estadístico.....	22
5	RESULTADOS.....	24
5.1	Composición de tallas de <i>L. olivacea</i>	27
5.1.1	Medidas de Tendencia central.....	28
5.2	Composición Bacteriana.....	29
5.3	Similitud de los sitios de muestreo.....	31
5.3.1	Similitud bacteriana de la muestra nasal en los sitios de anidación.....	32
5.3.2	Similitud bacteriana de muestra del área cloacal de <i>L. olivacea</i> en los sitios de muestreo.....	36
5.4	Análisis microbiológico de las muestra de agua.....	37
5.5	ANOVA.....	38
6	DISCUSION.....	41
7	CONCLUSIONES.....	44
8	RECOMENDACIONES.....	45
9	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	46
10	ANEXOS.....	53

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Características descriptivas de las hembras anidantes de la especie <i>L. olivacea</i> en el área natural protegida complejo Los Cóbano.	24
Cuadro 2. Número de bacterias registradas durante los meses de muestreo de <i>L. olivacea</i> en el ANP Complejo Los Cóbano, Sonsonate.	25
Cuadro 3. Bacterias identificadas en el área nasal y cloacal de la tortuga <i>L. olivacea</i> en los diferentes sitios de anidación, del ANP Complejo Los Cóbano, Sonsonate, junio - octubre 2012.....	26
Cuadro 4. Medidas de tendencia central correspondiente a las tallas en centímetros de largo curvo del caparazón de las hembras anidantes de la especie <i>L. olivacea</i> en los diferentes sitios de anidación del ANP Complejo los Cóbano.....	28
Cuadro 5. Similitud entre los sitios de muestreo de poblamientos bacterianos nasales, en la tortuga <i>L. olivacea</i> en el ANP Complejo Los Cóbano, Sonsonate, junio - octubre 2012.....	31
Cuadro 6. Similitud de Bray-Curtis entre bacterias del área nasal de <i>L. olivacea</i> en los sitios de muestreo, del ANP Complejo Los Cóbano, Sonsonate, julio-octubre 2012.	33
Cuadro 7. Similitud entre los sitios de muestreo de poblamientos bacterianos cloacales, en el ANP Complejo Los Cóbano, Sonsonate, junio - octubre 2012.....	35
Cuadro 8. Poblamientos cloacales bacterianos en <i>L. olivacea</i> , en ANP Complejo Los Cóbano, Sonsonate, junio - octubre 2012.....	36
Cuadro 9. Géneros identificados en las muestras de agua en los sitios de muestreo del ANP Complejo Los Cóbano, Sonsonate.	37

Índice de Figuras

Figura 1. Ubicación de las playas de anidación de tortugas marinas, Arrecife Los Cóbano, Sonsonate.	17
Figura 2. Playa El Faro situada en el ANP Complejo Los Cóbano, Sonsonate..	18
Figura 3. Playa El Cocal situada en el ANP Complejo Los Cóbano, Sonsonate.	18
Figura 4. Playa Salinitas situada en el ANP Complejo Los Cóbano, Sonsonate.	19
Figura 5. Talla de hembras anidantes de la especie <i>L. olivacea</i> en el ANP Complejo Los Cóbano, Sonsonate, junio - octubre 2012.....	27
Figura 6. Tallas en centímetros de largo curvo del caparazón de las hembras anidantes de la especie <i>L. olivacea</i> que se encontraron en los diferentes sitios de anidación del ANP Complejo los Cóbano.	28
Figura 7. Porcentaje de grupos bacterianos identificadas en las fosas nasales de las hembras de <i>L. olivacea</i> en el ANP Los Cóbano.....	29
Figura 8. Porcentaje de grupos bacterianos identificadas en la cloaca de las hembras anidantes de <i>L. olivacea</i> en el ANP Los Cóbano, Sonsonate, junio - octubre 2012.....	30
Figura 9. Porcentaje de Similitud entre los sitios de muestreo de poblamientos bacterianos nasales, ANP Complejo Los Cóbano, Sonsonate, junio - octubre 2012.....	32
Figura 10. Similitud de muestra nasal de la tortuga <i>L. olivacea</i> en los sitios de muestreo, del ANP Complejo Los Cóbano, Sonsonate, junio - octubre 2012.....	34
Figura 11. Porcentaje de Similitud entre los sitios de muestreo de poblamientos bacterianos cloacales de <i>L. olivacea</i> , en ANP Complejo Los Cóbano, Sonsonate, junio - octubre 2012.....	35
Figura 12. Similitud de muestra cloacal de <i>L. olivacea</i> en los sitios de muestreo, ANP Complejo Los Cóbano, Sonsonate, junio - octubre 2012.	37

RESUMEN

Durante su ciclo de vida las tortugas marinas están expuestas a muchos peligros, cada año mueren al ser capturadas accidentalmente en las redes de pesca, víctimas de la pérdida de hábitat de áreas de alimentación y anidación, debido al desarrollo costero e incremento del turismo, lo anterior ha ocasionado que se les considere como especies en peligro o amenazadas de extinción. La mayoría de las enfermedades de las tortugas marinas aún no han sido descritas; por lo que es necesario conocer las bacterias que se encuentran presente en el organismo y los posibles vectores de enfermedades.

El objetivo del presente estudio fue determinar la composición de la flora bacteriana en el área nasal y cloacal de las tortugas marinas *Lepidochelys olivacea* durante su época de anidación entre los meses de junio a octubre del año 2012, se colectaron muestras bacteriológicas provenientes de 20 hembras anidantes mediante recorridos nocturnos en tres playas El Faro, El Cocal y Salinitas pertenecientes al Área Natural Protegida Complejos Los Cóbanos Departamento de Sonsonate, El Salvador.

Las muestras se colectaron a través del uso de hisopos estériles que se introdujeron en la cloaca durante el desove y en uno de los conductos nasales. Estas fueron trasladadas en al laboratorio de Biología de la Universidad de El Salvador en menos de 24 horas para su posterior análisis.

En el laboratorio las muestras nasales fueron cultivadas en agar sangre, MacConkey y agar manitol sal, las cloacales fueron cultivadas en agar sangre, MacConkey, TCBS y XLD, a todas las colonias aisladas se les realizaron pruebas bioquímicas rutinarias IMVIC. Además se utilizó API 20E.

Se identificaron un total 18 géneros bacterianos, en total 3 Gram positivos y 15 Gram negativos. Las bacterias más frecuentes identificadas en las cavidades nasales fueron *Staphylococcus sp*, *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella sp* y en el área cloacal *Vibrio sp*, *salmonella* y *E. coli*.

Estadísticamente el análisis de similitud Bray-Curtis determinó que los sitios de anidación en relación a las bacterias presenta una similitud de un 59.48% correspondiente al área nasal y de un 55.05% para el área cloacal en las playas de Salinitas y el Cocal.

El estadístico ANOVA demuestra que existen diferencias significativas entre los tratamientos utilizados, sitios de muestreo por grupos de bacterias del área nasal y cloacal; por tanto se acepta la hipótesis nula.

La flora bacteriana determinada de las muestras nasales y cloacales de la tortuga *Lepidochelys olivacea* está dada en su mayoría por bacterias altamente patógenas, las cuales son parte de la flora normal, pero que en condiciones de estrés son causantes de enfermedades infecciosas.

1 INTRODUCCIÓN

En El Salvador anidan cuatro especies de tortugas de siete que actualmente habitan en el planeta: “carey” *Eretmochelys imbricata*; “baule” *Dermochelys coriacea*; “golfina” *Lepidochelys olivacea* y “prieta” o “negra” *Chelonia mydas agassizii* (Dueñas, 2009; Vásquez *et al*, 2009).

Los estudios de la flora bacteriana son importantes para entender los riesgos potenciales de la zoonosis; así como también de los posibles riesgos que los seres humanos están expuestos por el consumo de los huevos o de la fertilidad de estos para su efectividad en los nacimientos de quelonios (Gámez *et al*, 2007).

Debido a la falta de información en el país sobre el impacto de las enfermedades infecciosas bacterianas en las poblaciones de tortugas marinas que anidan en las diferentes playas de nuestro país y sobre el papel que varios microorganismos puedan desarrollar como agentes patógenos (Santoro *et al*, 2002). Surge este trabajo con el objetivo de conocer la flora bacteriana nasal y cloacal de la tortuga “golfina” *L. olivacea* que anida en las playas El Faro, El cocal y Salinitas del Área Natural Protegida Complejo Los Cóbanos.

El estudio se realizó durante los meses de Junio a Octubre de 2012, mediante recorridos nocturnos basados en el calendario de mareas, durante tres noches a la semana, con un tiempo estimado de ocho horas por noche, en el cual se colectaron muestras bacteriológicas de área nasal y cloacal al momento del desove, empleando la metodología propuesta por Santoro *et al*, 2003.

Las muestras colectadas fueron transportadas al laboratorio de la Escuela de Biología de la Universidad de El Salvador, para su respectivo análisis se inocularon en medios de cultivo selectivo como Agar Sangre, MacConkey, Agar TCBS, XLD y Manitol Sal, además; se realizaron diferentes pruebas bioquímicas como IMVIC y API para la confirmación de los microorganismos.

Para el análisis de los datos se utilizó estadística descriptiva y no paramétrica como análisis de similitud de Bray-Curtis y ANOVA.

De un total de 20 tortugas de la especie *L. olivacea* muestreadas durante el estudio de la flora bacteriana Nasal y Cloacal, se identificaron 18 géneros bacterianos, 3 correspondientes a Gram Positivas y 15 Gram Negativas. Entre las bacterias más representativas están *Vibrio sp*, *Staphylococcus sp*, y *Klebsiella sp*.

El estudio demuestra que existe una mayor similitud entre la playa Salinitas y el Cocal en relación a los géneros bacterianos identificados.

Las bacterias identificadas son altamente patógenas para las tortugas marinas ya que pueden portarse como oportunistas y aprovechar las condiciones de estrés, así también desatar zoonosis relacionada por el consumo de huevos, carne o su manipulación.

2. FUNDAMENTO TEORICO

2.1 Características generales de las tortugas marinas.

Las tortugas marinas son vertebrados fáciles de reconocer por su concha, que sirve de protección para los órganos internos consiste de una parte dorsal llamada caparazón y una parte ventral denominada plastrón. Carecen de dientes en las mandíbulas. Tienen oídos primitivos, un excelente sentido del olfato y una buena visión bajo el agua. Sus aletas son largas y las delanteras presentan una o dos uñas reducidas. La cola es corta en las hembras y más larga en los machos (Aleman, 2010; CIT, 2004).

Son animales de sangre fría y utilizan la luz solar para calentar sus cuerpos porque no son capaces de mantener una temperatura corporal constante. Las tortugas marinas respiran por medio de pulmones, emergiendo periódicamente para respirar (Eckert, 1989).

2.2 Características de *Lepidochelys olivacea*

La Tortuga “golfina” posee una coloración verde oscuro la longitud del caparazón puede medir entre los 60 y 70 cm. Posee de 5 a 9 pares de escudos laterales a veces impares. Tienen dos pares de escamas prefrontales. Dos uñas en cada aleta delantera. Esta es la especie más numerosas, es pequeña y los adultos pueden pesar entre 35 y 45 Kg (Chacón, 2004) (Anexo 1).

Estos quelonios prefieren arrecifes, bahías, lagunas costeras y zonas de aguas someras. Las crías son pelágicas durante un tiempo no determinado. Aparentemente es carnívora en sus diferentes etapas de desarrollo. Se alimentan durante el día de organismos pelágicos a través de sus migraciones, consumen huevecillos de peces e incluso colonias de tunicados. Comúnmente en la zona costera se alimenta de camarones, medusas, cangrejos, caracoles, peces, calamares y cantidades mínimas de algas, pastos marinos y mangle entre otros (Soria, 2011).

La temporada de anidación es de junio a noviembre, aunque se han observado anidaciones esporádicas en el resto de los meses del año. Tiene una reproducción anual. Las hembras anidan de dos a tres veces por temporada, con intervalos de 14 a 48 días. La profundidad y el ancho del nido son aproximadamente de 45 y 30 cm. El tamaño de la nidada es de 80 a 110 huevos, de forma redonda con un diámetro promedio 3.2 a 4.8 cm, con un periodo de incubación de 46 a 65 días (Chacón, 2007; Sánchez, 2007).

2.3 Amenazas para su supervivencia

Las tortugas marinas presentan una alta mortalidad tanto por amenazas naturales y antropogénicas (Anexo 2). Entre las amenazas que afectan directamente a las tortugas se pueden encontrar:

- a) Recolecta de huevos; realizada por el hombre, con uso comestible y comercial.
- b) La cacería más importante es la que intencionalmente se hace para consumir la carne, aceites y luego vender el caparazón.
- c) Pesca incidental; la colocación de dispositivos pesqueros que atrapan especies que no son el objetivo, de manera tal que ocasionalmente varias especies de tortuga marina caen en las redes.
- d) Depredación por animales domésticos y salvajes; de huevos y neonatos.
- e) Las tortugas estas expuestas a muchas enfermedades infecciosas y la más grave y potencialmente cruel es el fibropapiloma que aminora las capacidades fisiológicas de las tortugas hasta provocar la muerte (Marcano, 2006; Chacón, 2004; CIT, 2004).

Hasbún & Vásquez, 1995 mencionan las amenazas que afectan el hábitat alterando los ciclos de nutrientes, los flujos de energía y la red trófica se pueden encontrar.

- a) La construcción de estructuras altera la morfología de la zona costera, ya que instalan iluminación, incrementan la generación de ruidos, promueven el turismo, la contaminación y la pérdida de biodiversidad.
- b) Desechos sólidos y líquidos; esta amenaza puede provenir del espacio inmediato como las comunidades colindantes al arrecife coralino, pero también de zonas cuenca arriba. Tal es el caso de la madera y desechos que llegan a la playa desde los ríos a la corriente, para luego con la marea y las olas terminan depositados en la playa provocando una pérdida de hábitat de anidación porque en ocasiones constituyen grandes barreras físicas.

Los desechos líquidos pueden dividirse en aquellos que nitrifican el medio como los encontrados en las aguas negras, los que contaminan que son típicos en aguas de drenaje como detergentes, blanqueadores, así como los químicos sintéticos asociados a la agricultura. Los derrames de petróleo también constituyen problemas severos para las tortugas y los diferentes hábitats marinos (García, 2011; Chacón, 2004; Buitrago, s.a).

Los quelonios están expuestos a microorganismos patógenos presentes en el agua los cuales pueden causales la muerte o pueden ser transmitidos a los humanos a través del consumo de los huevos.

2.4 Microorganismos en tortugas marinas

El término flora microbiana normal se utiliza para designar a aquellos microorganismos que habitan normalmente en los individuos sanos, sin provocar invasión.

El significado de la flora bacteriana que se puede encontrar en reptiles se entiende solo cuando se considera la interacción que existe entre los hospederos y el medio ambiente. Snipps *et al* (1980); Lawrence & Needham (1985), observaron como las especies de bacterias que se aíslan en tortugas en buen estado de salud frecuente no se diferencian significativamente de las que se encuentran en tortugas enfermas.

Glazebrook & Campbell (1990), indican que poco se conoce sobre el impacto 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. Muchas bacterias han sido identificadas como las causantes de enfermedades en tortugas marinas mantenidas en cautiverio, sin embargo; se conoce que muchos microorganismos pueden ser causa de elevada mortalidad en otras especies de animales marinos de vida libre. Además, muchas de estas bacterias son patógenas para los humanos (Santoro *et al*, 2002).

Géneros como: *Aeromonas* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus* spp., *Acinetobacter* spp., *Citrobacter* spp., son potencialmente patógenas para las tortugas, que pueden portarse como oportunistas, ingresar en los tejidos dañados por traumas o aprovechar las condiciones de estrés causando enfermedades graves. Han sido asociadas a enfermedad cutánea septicémica ulcerativa, dermatitis papilar, dermatitis focal erosiva, dermatitis ulcerosa traumática, dermatitis necrosante, estomatitis ulcerosa, rinitis obstructiva, queratoconjuntivitis, septicemia, bronconeumonía y osteomielitis. (Orós, 2004; Santoro *et al*, 2002).

Existen más de 2300 serotipos de *Salmonella*, muchos de los cuales fueron encontrados en reptiles silvestres y en cautiverio, algunos de estos en quelonios marinos. Estos microorganismos son conocidos como causa de enfermedades oportunistas principalmente cuando los hospederos están debilitados y

ocasionalmente como causa de gastroenteritis en los seres humanos por consumo de carne de tortuga (Santoro *et al*, 2002).

2.5 Familias bacterianas

2.5.1 Familia Aeromonadaceae

Familia de Bacterias Gram negativas, facultativamente anaerobias, ubicuas en aguas dulces y salobres, asociadas con enfermedades gastrointestinales se han descrito más de 21 especies, que se agrupan en tres complejos principales: *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii* (Silva, 2011).

Aeromonas

Este género pertenece a la familia *Aeromonadaceae*, es una bacteria con forma de bacilo, Gram negativos anaerobia. Son móviles por flagelos polares. Son oxidasa y catalasa positiva. Metabolizan hidratos de carbono por fermentación (gas puede ser producido a partir de glucosa), licua la gelatina y reduce los nitratos. Se han descrito 23 especies de *Aeromonas*, la mayoría de las cuales han sido asociadas con enfermedades humanas tales como: diarrea aguda se presenta con fiebre < 38°5 C, deposiciones líquidas y en los niños pequeños, vómitos en alrededor del 75 % de los casos. Las otras formas de presentación son con heces disenteriformes con moco y sangre, las localizaciones extraintestinales son: sepsis, peritonitis, meningitis, neumonía, endocarditis, infección urinaria, conjuntivitis. Son de vida libre y se encuentran en agua dulce o salada (González *et al*, 2004; Kirov, 1997).

2.5.2 Familia Enterobacteriaceae

Las enterobacterias son de la familia de las Enterobacteriaceae, la cual está constituida por bacilos Gram negativos, hay especies móviles y muy pocos inmóviles. Todas fermentan la glucosa con producción de ácido y gas, reducen los nitratos a nitritos. Ellos son aeróbicas, anaerobios facultativos, oxidasas negativas y fermentativas (Collins *et al*, 2004)

Acinetobacter sp.

Son Gram negativas, no móviles, aerobios obligados, oxidasa y la reducción del nitrato negativo, catalasa positivo, y son oxidativo, se encuentran ampliamente diseminadas en la naturaleza, siendo el agua y el suelo sus principales nichos ecológicos. Las enfermedades que causa son: bacteriemia, meningitis secundarias a malformaciones congénitas o infecciones previas por otros microorganismos e infección del tracto urinario, pero su papel predominante es como agente causal de neumonía (Collins *et al*, 2004; Salazar y Nieves s.a.).

Citrobacter sp.

Es un bacilo Gram negativo, aerobios, es un organismo móvil, variable indol, crece en citrato y es H₂S positivos, pero la prueba de lisina descarboxilasa negativa. Hidrólisis de la urea es variable. Este género es encontrado con mucha frecuencia en el agua, el suelo, la comida y como flora saprófita en el tracto intestinal de animales y humanos; son microorganismos ubicuos que son causa frecuente de infecciones importantes, especialmente en huéspedes inmunodeprimidos. En los seres humanos producen, por ejemplo, infecciones urinarias, meningitis neonatal y abscesos cerebrales. Destruyendo las microvellosidades del intestino, formando lesiones muy características denominadas de adherencia y eliminación (Collins *et al*, 2004; Madigan *et al*, 2003).

Enterobacter

Estas son móviles, indol negativo, MR negativa y VP positivo, crece en citrato y no produce H₂S y la prueba lisina descarboxilasa es negativa. Se encuentra en las aguas residuales y en agua contaminada suelen colonizar en particular a los tratados por infecciones de quemaduras, heridas, las vías respiratorias y del tracto urinario (Collins *et al*, 2004; Madigan *et al*, 2003).

Escherichia

Es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, móvil por flagelos peritricos, no forma esporas, es capaz de fermentar la glucosa y la lactosa, es indol positiva,

citrato negativo, MR positivo, VP y H₂S negativo. Se encuentra generalmente en los intestinos animales, y aguas negras, pero se lo puede encontrar en todos lados, dado que es un organismo ubicuo. Las enfermedades causadas por *E. coli* son: Enfermedades gastrointestinales como la diarrea acuosa, fiebre, vómitos e infecciones urinarias (Gyles *et al*, 2010; Collins *et al*, 2004; Madigan *et al*, 2003).

Klebsiella sp.

El hábitat general de este géneros es el suelo, y el agua. La mayoría de las Klebsiellas puede fijar nitrógeno, propiedad que no se encuentra en ninguna otra enterobacteria. Son Indol negativo y da una lisina descarboxilasa positiva reacción, pero no produce H₂S. Es ureasa positiva y β-galactosidasa. Se asocia con infecciones respiratorias graves como la neumonía, Infección abdominal, bacteriemia, endoftalmitis y osteomielitis (Madigan, *et al*, 2003; Fariñas, s.a).

Pantoea

Es un bacilo Gram negativo, sin cápsula, aerobio facultativo, es móvil y negativo para lisina descarboxilasa, arginina y ornitina. Su hábitat es ubicua, plantas, agua, heces animales y humanos (Cruz *et al*, 2007).

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; Pegues s.a).

2.5.3 Familia Flavobacteriaceae

La familia Flavobacteriaceae se compone de bacterias ambientales. son bacilos Gram negativos, las bacterias son de color amarillo. La mayoría de las especies son aeróbicas, algunos son microaerobia a anaeróbica, por ejemplo de *Ornithobacterium*, *Capnocytophaga* y *Coenonia* (Collins *et al*, 2004).

Chryseobacterium

Los microorganismos del grupo *Chryseobacterium* son bacilos largos, delgados, inmóviles y Gram negativos, oxidasa positivos, son proteolíticos y débilmente fermentadores. A menudo forman colonias de color amarillas distintivas. Las *Chryseobacterias* suelen detectarse en drenajes, grifos y en equipo médico que se ha expuesto al agua contaminada y no esterilizada. A veces colonizan el aparato respiratorio (Brooks *et al*, 2011).

2.5.4 Familia Neisseriaceae

Son bacterias Gram negativas, aerobias estricto. Cuenta con 14 géneros no presentan esporas, inmóvil, hay cepas encapsuladas y otras producen un pigmento verde amarillento, catalasa y oxidasa positivo, poco fermentadores (Fernández, 2003).

Chromobacterium

Una característica importante de este género es la producción de un pigmento violeta. Son bacterias Gram negativas, facultativamente anaerobias, en forma de bastoncillos, que se encuentran en el suelo y en el agua. Dan positiva la prueba de catalasa y negativa la prueba de ureasa, además; son oxidasa positiva pero difícil de hacer si el pigmento está bien formado. Patógeno oportunista que puede causar infección tanto en personas sanas como inmunodeprimidos, pueden producir enfermedades como Osteomielitis y Meningitis y en algunas especies producen infecciones en mamíferos, incluidos los humanos. (Sandoval, 2009; Collins *et al*, 2004; Guevara *et al*, 2007).

2.5.5 Familia Pasteurellaceae

Las bacterias de esta familia son inmóviles y se conocen sobre todo como patógenas humanas y de animales (Tortora *et al*, 2007).

Pasteurella

Las especies de este género son bacterias Gram negativas con morfologías muy dispares que van desde cocobacilos pequeños hasta bacilos largos y filamentosos. Son aerobias o anaerobias facultativas. Catalasa y oxidasa positivas. Son inmóviles, el hábitat de estos microorganismos puede ser el medio ambiente en general, pero más frecuentemente forman parte de la microbiota de la región nasofaríngea en distintas especies domésticas. *P. multocida* es el patógeno humano más importante; la Pasteulosis humana consiste en heridas infectadas por mordeduras o rasguños de gatos o perros y ocasionalmente de otros animales, afecciones del sistema respiratorio o afecciones localizadas en diferentes órganos y tejidos (Cueto *et al*, s.a.).

2.5.6 Familia Pseudomonadaceae

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

Flavimonas

Bacilo Gram negativo, aerobio no fermentador, móvil por un flagelo polar, crece a temperaturas que varían entre 18°C a 42°C, es oxidasa negativa y catalasa positiva. Se cultivan bien en agar MacConkey y en agar Cetrimide, produce colonias circulares con aspecto liso brillante de color amarillo y miden de 0.5 mm a 1 mm de diámetro. No producen hemólisis en agar sangre (Gutiérrez *et al*, 2009).

Pseudomona sp.

Las *Pseudomonas* son bacilos Gram negativos, móviles y aerobios, algunos de los cuales producen pigmentos hidrosolubles, sin esporas, siempre móviles, por flagelos polares; metabolismo oxidativo, catalasa positiva y RM-VP negativo. Es

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 all*, 2004).

2.5.7 Familia Staphylococcaceae

Los estafilococos son células esféricas Gram positivas por lo general dispuestas en racimos irregulares parecidos a las uvas. Se desarrollan rápidamente en muchos tipos de medios y tienen actividad metabólica, fermentan carbohidratos y producen pigmentos que varían desde un color blanco hasta un amarillo intenso (Collins and Lyne's, 2004).

Staphylococcus sp.

Son bacterias Gram positivos, aerobios, con metabolismos respiratorio típicos, son catalasa positivos lo que les permite diferenciarse del género *Streptococcus* y otros géneros de cocos Gram positivos, soportan altas concentraciones de NaCl proporcionando una buena herramienta para su identificación. *Staphylococcus* es un anaerobio facultativo y produce ácido de la glucosa tanto en anaerobiosis como en anaerobiosis (Collins *et al*, 2004).

Staphylococcus aureus

Esta especie es la coagulasa y fosfatasa positiva, forma ácido a partir de manitol, trehalosa y sacarosa, y es sensible a la novobiocina. Algunas cepas son hemolítica en agar sangre de caballo, pero la zona de hemólisis es relativamente pequeña en comparación con la diámetro de la colonia. Es causante de infecciones del tracto respiratorio inferior, enfermedades de la piel, heridas quirúrgicas y neumonía (Collins *et al*, 2004; Preseatt *et all*, 2004).

2.5.8 Familia Streptococcaceae

Los estreptococos son bacterias esféricas Gram positivas que de manera característica forman pares o cadenas durante su multiplicación. Tienen una

amplia distribución en la naturaleza. Algunos son miembros de la microflora normal de los seres humanos, otros están relacionados con enfermedades humanas importantes atribuibles en parte a la infección por estreptococos, y en parte a la sensibilización a ellos. Los estreptococos elaboran diversas sustancias y enzimas extracelulares. 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. Ellos son anaerobio facultativo y algunos requieren mayor concentración de CO₂. Es causante de enfermedades respiratorias faringitis, Meningitis y Neumonía (Collins *et al*, 2004; Preseatt *et al*, 2004).

2.5.9 Familia Vibrionaceae

Los miembros de esta familia son bacilos Gram negativos anaerobios facultativos, muchos de ellos son ligeramente curvos, se les encuentra sobre todo en hábitats acuático (Tortora *et al*, 2007).

Vibrio

El género *Vibrio* incluye al menos 40 especies, Contiene organismos bacilares incurvados, Gram negativos, anaerobios facultativos, poseen un metabolismo fermentativo y rara vez producen gas. La mayoría de los miembros del grupo de *Vibrio* poseen flagelos polares, aunque algunos peritricos. Una diferencia importante entre este grupo y el del grupo entérico es su carácter de oxidasa positiva y son catalasa positiva, los *Vibrios* se producen de forma natural en el agua dulce y salada. Las especies incluyen microorganismos patógenos tanto para humanos como para peces causando enfermedades estomacales via de contaminación; aguas contaminadas y alimentos expuestos a aguas contaminadas (Sánchez, s.a.; Collins *et al*, 2004; Madigan, et al, 2003).

2.5.10 Familia Xanthomonadaceae.

Es una familia de bacterias Gram negativas. Dentro de este grupo se incluye la especie *Xanthomonas campestris*, de vital importancia para la producción industrial del exopolisacárido xantano, así como la especie *Stenotrophomonas* (Koneman *et al*, 2008).

Stenotrophomonas

Es un bacilo Gram negativos, es oxidasa negativo y lisina descarboxilasa positivo. Posee desde especies comunes del suelo hasta patógenos oportunistas en humanos causando Infecciones a nivel pulmonar y urinario en pacientes inmunodeprimidos (Brooks *et al*, 201; Madigan, *et al*, 2003).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Determinar la presencia de microorganismos patógenos que forman parte de la flora bacteriana nasal y cloacal de tortuga “golfinia” *Lepidochelys olivacea* especie anidante en el Área Natural Protegida Complejo Los Cóbanos, Sonsonate, El Salvador.

3.2 Objetivos específicos

- Establecer la composición de bacterias patógenas del área nasal y cloacal de la tortuga “golfinia” *Lepidochelys olivacea*.
- Evaluar las diferencias bacterianas entre los sitios de anidación de las tortugas *Lepidochelys olivacea*.
- Estipular el promedio de tallas de hembras anidantes de la tortuga *Lepidochelys olivacea* en los sitios de anidación.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Ubicación Geográfica

La Playa de Los Cóbanos, se localiza a 11 kilómetros al oriente de Acajutla, departamento de Sonsonate. Coordenadas 13° 35' 67" latitud norte y 89° 45' 10" longitud oeste y los 13° 35' 71" latitud norte y 89° 45' 15" longitud oeste (I.G.N, 1971).

El paisaje costero de Los Cóbanos, es una combinación de pequeñas playas en las que predominan restos de conchas y roca volcánica. El paisaje submarino de la zona litoral está constituido por formaciones rocosas de origen volcánico muy notorias en la faja intermareal. La terraza marina de abrasión se caracteriza por su escasa profundidad y la presencia de abundantes algas rojas coralinas. A menos de 75 metros de la línea de playa es frecuente encontrar formaciones coralinas con diámetros mayores de 50 centímetros. Esas formaciones adquieren dimensiones considerables, constituyendo un arrecife de parches coralinos (Tejada, 2010; Carballo y Pocasangre, 2007; Cortez *et al*, 2004).

La conformación del fondo es abundante en depresiones o pozas de mareas que se combinan con grutas y grietas naturales en las rocas, constituyendo el hábitat natural de innumerables especies de equinodermos, moluscos, peces y otros organismos. Cabe mencionar que el arrecife de Los Cóbanos cuenta con una valiosa riqueza biológica y es visitado por las cuatro especies de tortugas marinas que arriban a El Salvador (Tejada, 2010; Carballo y Pocasangre, 2007; Cortez *et al*, 2004).

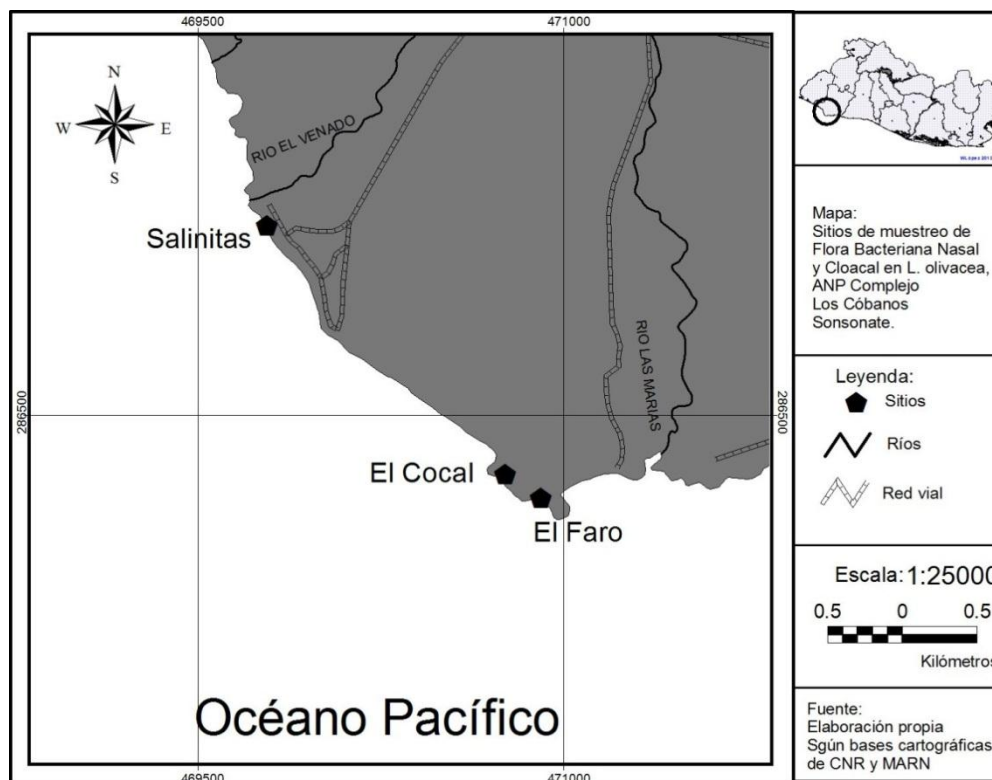


Figura 1. Ubicación de las playas de anidación de tortugas marinas, Arrecife Los Cóbano, Sonsonate.

4.2 Localización y descripción de los sitios de muestreo.

Las playas que conforman el ANP Complejos Los Cóbano monitoreadas durante el estudio están constituidas por arena blanca o clara esto se debe a la composición de fragmentos de coral y concha. Dentro de las principales playas registradas en los reportes por (Liles *et al*, 2011; Vásquez *et al*, 2008) y en las que se centró el estudio están:

Playa El Faro:

Con una ubicación geográfica de 13° 31' 26.9" latitud norte y 89° 45' 21.7" longitud oeste. Cuenta con numerosas depresiones que forman pozas de marea arenosas, con pequeños agregados formados por restos de coral, en cuyos extremos existen promontorios peñascos inclinados conocidos como farellones los cuales sirven

para delimitar las playas. Además; presenta rocas de mediano tamaño en algunas zonas de la playa. La vegetación de la playa está constituida por campanilla de playa, manzanillo, flor de mayo y carbón. Es muy visitada por los turistas por las diversas actividades recreativas. Dicha playa se encuentra rodeada por la comunidad de Los Cóbanos, existiendo una mayor influencia de los pobladores y la presencia de establecimientos hoteleros y restaurantes algunos de los cuales generan contaminación a la zona (Carballo y Pocasangre, 2007).

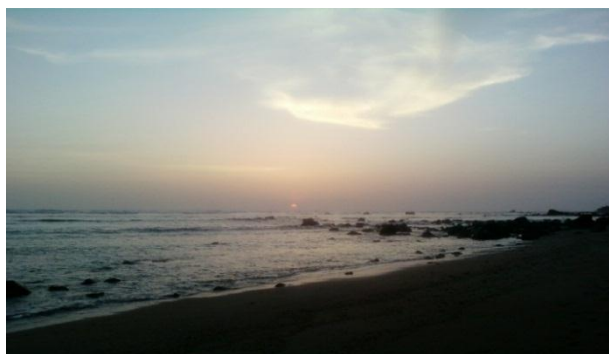


Figura 2. Playa El Faro situada en el ANP Complejo Los Cóbanos, Sonsonate.

Playa El Cocal

Con una ubicación geográfica de 13° 31' 34.0" latitud norte y 89° 48' 35.4" longitud oeste. Playa rocosa; la arena está constituida por restos de coral, rodeada por farellones que delimitan la playa. Además, presenta rocas de mediano tamaño en algunas zonas de la playa. La vegetación de la playa está constituida principalmente por cocoteros de allí deriva el nombre de la playa. Es poco visitada



por los turistas. Dicha playa se encuentra rodeada por un solo rancho el cual se desplaza a lo largo de la playa el cual cuenta con una elevación de 14 m.s.n.m.

Figura 3. Playa El Cocal situada en el ANP Complejo Los Cóbanos, Sonsonate.

Playa Salinitas

Con una ubicación geográfica de 13° 32' 23.5" latitud norte y 89° 49' 22.1" longitud oeste. Cuenta con numerosas depresiones que forman pozas, es una playa rocosa la arena está constituida por restos finos de coral y presenta rocas de gran tamaño en algunas zonas de la playa. La vegetación de la playa está constituida por campanilla de playa, manzanillo, flor de mayo, almendro y botoncillo. Esta playa es muy visitada por los turistas y se encuentra rodeada por una red hotelera y muchos ranchos los cuales generan contaminación en la zona (Molina *et al*, 2006).



Figura 4. Playa Salinitas situada en el ANP Complejo Los Cóbanos, Sonsonate.

4.3 Metodología de Campo

Basado en los reportes de Vásquez *et al*, (2009), el área de estudio fue dividida en 3 sitios de muestreo: El Faro, El Cocal y Salinitas. La fase de campo comprendió los meses de junio a octubre del año 2012. Realizando un total de 31 viajes y colectando un total de 40 muestras bacteriológicas de la fosa nasal y cloaca de 20 hembras anidantes.

Las faenas consistieron en patrullajes para la búsqueda de anidantes, en total se realizaron 318 horas de esfuerzo durante la noche a partir de las 6:00 pm con el apoyo de los guardarrrecursos de la Fundación para La Conservación del Arrecife de Los Cóbanos FUNDARRECIFE y la Policía Nacional Civil.

4.3.1 Colecta de la muestra

Muestra Cloacal

Las muestras cloacales se obtenían, durante el desove de la tortuga, es decir al momento de poner los huevos. Se realizó introduciendo un hisopo estéril directamente en la cloaca en un tiempo aproximado de 15 s, frotando suavemente entre la mucosa de la pared, para que los microorganismos se adhieran al hisopo, posteriormente se retiraba el hisopo y se colocaba en un tubo que contenía medio de transporte Stuart's. (Anexo 3).

Muestra Nasal

Para la obtención de las muestras nasales, se limpió con un paño de papel estéril desechable la arena de la parte externa del rostro, y se procedió a introducir un hisopo estéril en uno de los conductos nasales en un tiempo aproximado de 10 s, los hisopos posteriormente se retiraban y se colocaban en un tubo de ensayo que contenía medio de transporte Stuart's.

4.3.2 Conservación y transporte de la muestra

Las muestras colectadas fueron etiquetadas con los siguientes datos: nombre de la playa, área de la muestra, fecha y hora posteriormente colocadas en una hielera a más o menos 4°C. Todas las muestras fueron llevadas, en menos de 24h al Laboratorio de microbiología de la Escuela de Biología, Universidad de El Salvador (Anexo 4).

4.3.3 Caracterización de la tortuga

Se realizó la identificación de la especie; posteriormente se procedió a tomar datos morfométricos de Largo y Ancho curvo del Caparazón de la tortuga y se marcaron ambas aletas anteriores con placas metálicas Inconel (Anexo 5).

4.4 Metodología de Laboratorio

El estudio comprendió la búsqueda de enterobacterias como: *E. coli*, *Salmonella*, *Vibrio*, *Staphylococcus aureus* y otros que se encuentran en los quelonios tomando como base estudios previos realizados en otros países (Santoro *et al*, 2003)

Los hisopos cloacales se inocularon directamente en el medio: agar Sangre, agar MacConkey y agar TCBS. Además, para detectar la presencia de *Salmonella*, las muestras cloacales fueron incubadas a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 18 horas en medio de enriquecimiento Rappaport-Vassiliadis-Soya peptone, luego se sembraron en medio de cultivo XLD agar (Santoro *et al*, 2003) (Anexo 6).

El material obtenido de los hisopos nasales se cultivó en agar sangre, agar MacConkey y agar manitol sal. Se incubó las placas protegidas de la luz a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 18 a 24 horas. Si los resultados eran negativos, se incubaban por 24 horas más (Anexo 7).

A todas las colonias aisladas, se les tomó datos morfológicos y se clasificaron por la tinción de Gram y finalmente fueron identificadas con pruebas bioquímicas rutinarias como: IMVIC

Además se utilizó API 20E para ello las colonias aisladas de los diferentes medios fueron sembradas en agar nutritivo y incubadas a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. A partir de la colonia bien aislada del microorganismo, se hizo una suspensión en 5 ml de solución salina (0.85% NaCl). para sembrarla en las galerías de 20E. Las galerías se incubaron a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 18-24 horas. Después del tiempo de incubación se revisaron los resultados, estos se ingresaron en el programa informático APIweb.

4.5 Análisis Estadístico

Para el análisis de los resultados se empleó estadística descriptiva y no paramétrica.

ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA

Se usó estadística descriptiva para la recolección, presentación, descripción, análisis e interpretación de los datos tomados durante el estudio, incluyendo parámetros morfométricos de las tortugas como el Largo Curvo del Caparazón, Ancho Curvo del Caparazón, golpes y mutilaciones.

La estadística Descriptiva se utilizó para resumir y describir el conjunto de datos; los datos se presentan en tablas de frecuencias, gráficos y medidas de tendencia central.

Medidas de Tendencia Central:

Media Aritmética \bar{X} y Mediana Me

ESTADÍSTICA NO PARAMETRICA

ANOVA:

Se utilizó 2 Análisis de Varianza (ANOVA) de dos vías.

Las Hipótesis fueron:

GRUPO DE BACTERIAS X TALLA

H₀: Existe diferencias significativas en los grupos de bacterias encontradas entre las tallas de la tortuga *L. olivacea* del ANP Complejo los Cóbano.

H_i: No existen diferencias significativas en los grupos de bacterias entre las tallas de la tortuga *L. olivacea* del ANP Complejo los Cóbano.

SITIO X GRUPOS DE BACTERIAS

H_0 : Existe diferencias significativas en los grupos de bacterias de la especie *L. olivacea* en los sitios de anidación del ANP Complejo los Cóbano.

H_1 : No existen diferencias significativas en los grupos de bacterias de la especie *L. olivacea* en los sitios de anidación del ANP Complejo los Cóbano.

Para el análisis de varianza se utilizó el software SigmaStat versión 3,1

Análisis de Similitud de Bray-Curtis:

Este se empleó para conocer si existe similitud de las cantidades y grupos de bacterias y las tallas de la tortuga en los diferentes sitios. Se utilizó el software Primer versión 5.

5 RESULTADOS

Para la colecta de las muestras se realizaron 31 viajes, durante los meses de junio a octubre del año 2012, en el Área Natural Protegida Complejo Los Cóbanos, en busca de las hembras anidantes en tres playas: El Faro, El Cocal y Salinitas obteniendo un total de 20 tortugas “golfina”.

Cuadro 1. Características descriptivas de las hembras anidantes de la especie *L. olivacea* en el área natural protegida complejo Los Cóbanos.

N°	HORA	FECHA	NOMBRE	PLACA		TALLA		PLAYA	# HUEVOS
				IZQUIERDA	DERECHA	LCC	ACC		
1	11:20 P.M	26/08/2012	Andrea	213	214	67 cms	72 cms	Salinitas	102
2	9:40 P.M	28/08/2012	Carracosta	217	218	65 cms	67 cms	El Cocal	112
3	1:25 A.M	29/08/2012	Milagro	219	220	65 cms	70 cms	El Faro	112
4	11:30 P.M	10/09/2012	Yuridia	236	237	68 cms	71 cms	Salinitas	119
5	11:40 P.M	10/09/2012	Angelica	238	239	65 cms	67 cms	Salinitas	84
6	9:30 P.M	10/09/2012	Karencita	227	228	64 cms	69 cms	El Cocal	100
7	1:30 A.M	12/09/2012	Sonia	225	226	68 cms	73 cms	El Faro	100
8	12:15 A.M	26/09/2012	Luciana	248	249	62 cms	68 cms	El Faro	84
9	8:00 P.M	26/09/2012	Bulma	242	243	67 cms	72 cms	Salinitas	132
10	11:15 P.M	26/09/2012	Nahomy	244	245	67 cms	73 cms	Salinitas	99
11	11:30 P.M	26/09/2012	Clarissa	246	247	68 cms	73 cms	Salinitas	100
12	1:00 A.M	01/10/2012	Juana	257	258	60 cms	67 cms	El Cocal	84
13	2:10 A.M	01/10/2012	Cristina	259	260	67 cms	74 cms	El Faro	112
14	8:40 P.M	07/10/2012	Somayra	262	263	69 cms	75 cms	Salinitas	133
15	10:30 P.M	07/10/2012	Yaritzza	264	265	62 cms	69 cms	Salinitas	84
16	3:53 A.M	09/10/2012	Georgina	251	252	67 cms	69 cms	Salinitas	72
17	4:21 A.M	09/10/2012	Maritza	253	254	62 cms	72 cms	El Cocal	77
18	9:20 P.M	09/10/2012	Gudelia	270	271	64 cms	68 cms	Salinitas	80
19	9:40 P.M	09/10/2012	Alexandra	272	273	63 cms	67 cms	Salinitas	84
20	10:00 P.M	22/10/2012	Yanira	255	256	69 cms	71 cms	Salinitas	112

Cuadro 2. Número de bacterias registradas durante los meses de muestreo de *L. olivacea* en el ANP Complejo Los Cóbanos, Sonsonate.

BACTERIA	JUNIO*	JULIO*	AGOSTO	SEPTIEMBRE	OCTUBRE
<i>Acinetobacter</i>	-	-	-	-	1
<i>Aeromonas sp</i>	-	-	1	2	3
<i>Chromobacterium</i>	-	-	-	-	1
<i>Chryseobacterium</i>	-	-	-	-	1
<i>Citrobacter</i>	-	-	-	3	-
<i>Enterobacter</i>	-	-	-	-	5
<i>Escherichia coli</i>	-	-	2	4	1
<i>Flavimonas</i>	-	-	-	-	1
<i>Klebsiella sp</i>	-	-	-	5	6
<i>Pantoea</i>	-	-	-	1	2
<i>Pasteurella</i>	-	-	-	-	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	2	2
<i>Salmonella</i>	-	-	-	4	3
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	1	4	5
<i>Staphylococcus sp</i>	-	-	3	5	6
<i>Stenotrophomonas</i>	-	-	-	-	1
<i>Streptococcus</i>	-	-	-	-	3
<i>Vibrio</i>	-	-	3	8	6

*Durante estos meses no se obtuvieron muestras de hembras anidantes dentro de los sitios de anidación.

En los meses de muestreo se colectaron 40 muestras, obteniendo un mayor número y frecuencia de géneros bacterianos en el mes de octubre, esto concuerda con Vázquez *et al* (2009) que exponen que los picos de anidación para la especie *L. olivacea* comprende los meses de agosto a octubre.

De las muestras procesadas se obtuvieron 18 géneros bacterianos (Cuadro 3); de los cuales 3 corresponden a Gram positivas y 15 Gram negativas. La bacterias que presentaron mayor frecuencia fueron: *Vibrio sp*, *Staphylococcus sp*, y *Klebsiella sp*.

Los resultados de la flora bacteria nasal y cloacal de la tortuga “golfina” *L. olivacea* se presentan a continuación.

Cuadro 3. Bacterias identificadas en el área nasal y cloacal de la tortuga *L. olivacea* en los diferentes sitios de anidación, del ANP Complejo Los Cóbanos, Sonsonate, junio - octubre 2012.

Bacterias	MUESTRA NASAL			MUESTRA CLOACAL		
	Sitios de Anidación			Sitios de Anidación		
	El Faro	El Cocal	Salinitas	El Faro	El Cocal	Salinitas
<i>Acinetobacter</i>	0	0	0	0	0	1
<i>Aeromonas sp</i>	0	1	5	0	0	0
<i>Chromobacterium</i>	0	0	1	0	0	0
<i>Chryseobacterium</i>	1	0	0	0	0	0
<i>Citrobacter</i>	0	0	1	0	0	2
<i>Enterobacter</i>	0	0	1	0	0	4
<i>Escherichia coli</i>	2	0	0	1	0	4
<i>Flavimonas</i>	1	0	0	0	0	0
<i>Klebsiella sp</i>	1	2	4	0	2	2
<i>Pantoea</i>	2	0	1	0	0	0
<i>Pasteurella</i>	0	0	1	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	1	0	1	2
<i>Salmonella</i>	0	1	1	1	1	3
<i>Staphylococcus sp</i>	3	2	7	2	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	2	6	0	0	0
<i>Stenotrophomonas</i>	0	0	1	0	0	0
<i>Streptococcus</i>	0	0	0	1	0	2
<i>Vibrio</i>	0	1	4	3	2	7

5.1 Composición de tallas de *L. olivacea*

Representación gráfica de tallas Largo Curvo de Caparazón de *L. olivacea* en el ANP Complejo Los Cóbanos, junio-octubre de 2012.

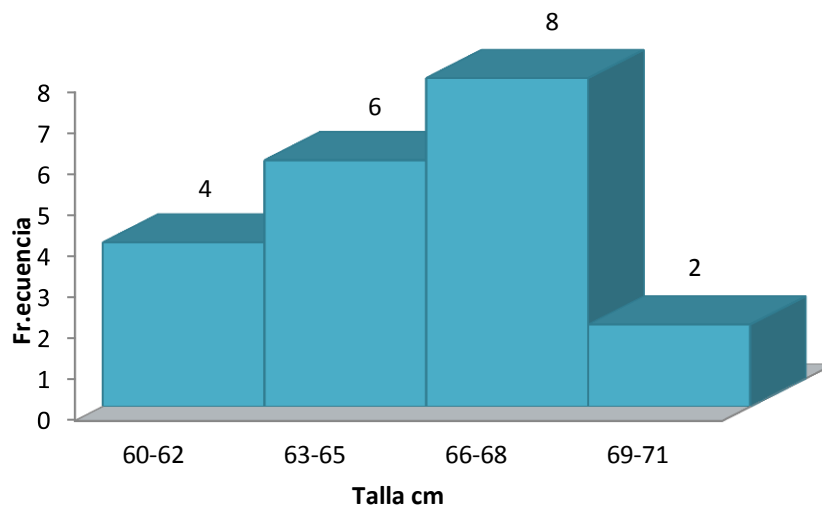


Figura 5. Talla de hembras anidantes de la especie *L. olivacea* en el ANP Complejo Los Cóbanos, Sonsonate, junio - octubre 2012.

La figura 5 presenta las diferentes tallas reportadas durante el estudio mostrando que de un total de 20 hembras anidantes de la especie *L. olivacea* muestreadas entre los meses de junio a octubre del 2012, ocho se encuentran en el intervalo de 66-68 cm. Mientras que en el intervalo de 69-71 cm solo se muestran dos tortugas pertenecientes a la playa Salinitas.

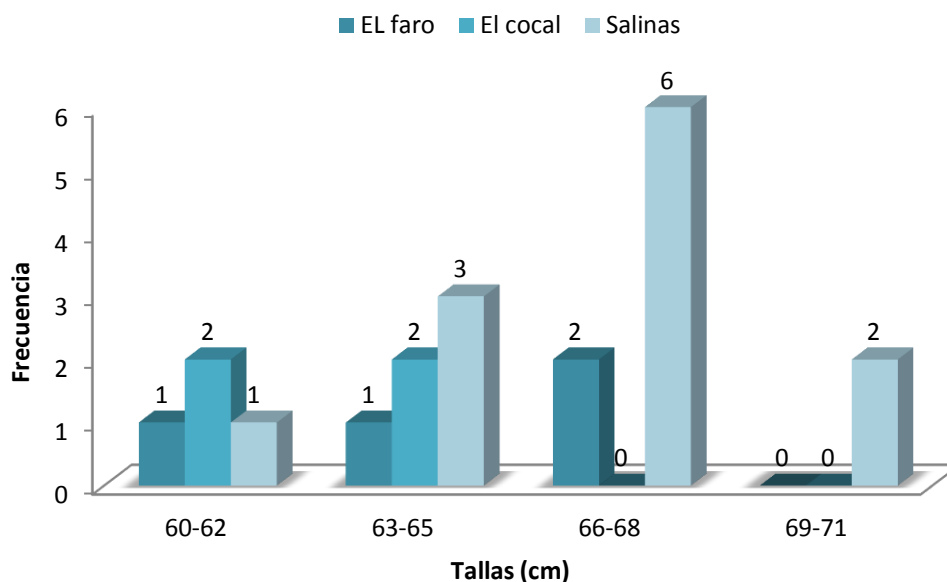


Figura 6. Tallas en centímetros de largo curvo del caparazón de las hembras anidantes de la especie *L. olivacea* que se encontraron en los diferentes sitios de anidación del ANP Complejo los Cóbanos.

La figura 6 muestra los datos de tallas en cm del Largo Curvo del Caparazón de hembras anidantes de la especie *L. olivacea* en relación a cada uno de los sitios de muestreo, perteneciente al ANP los Cóbanos durante los meses de junio a octubre de 2012, reportando un total de cuatro anidantes para la playa de El Faro, cuatro para El Cocal y un total de 12 para Salinitas.

5.1.1 Medidas de Tendencia central.

Cuadro 4. Medidas de tendencia central correspondiente a las tallas en centímetros de largo curvo del caparazón de las hembras anidantes de la especie *L. olivacea* en los diferentes sitios de anidación del ANP Complejo los Cóbanos.

Sitio de Muestreo	Media \bar{X}	Mediana Me
El Faro	65.5	66
El Cocal	62.75	63
Salinitas	66.33	67

El cuadro 4 muestra los datos de medidas de tendencia central para cada una de las playa El Faro, El Cocal y Salinitas presentando una media aritmética y mediana de las tallas en centímetro del Largo Curvo del Caparazón teniendo un dato mayor de \bar{X} para Salinitas con 66.33 y una mediana de 67 y un menor promedio de media y mediana para El Cocal, con 62.75 y 63.

5.2 Composición Bacteriana

Las bacterias presentes en las muestras nasales fueron: *Aeromonas sp*, *Chromobacterium*, *Chryseobacterium*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia coli*, *Flavimonas*, *Klebsiella sp*, *Pantoea*, *Pasteurella*, *Pseudomona aeruginosa*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus sp*, *Stenotrophomonas* y *Vibrio*.

MUESTRA NASAL

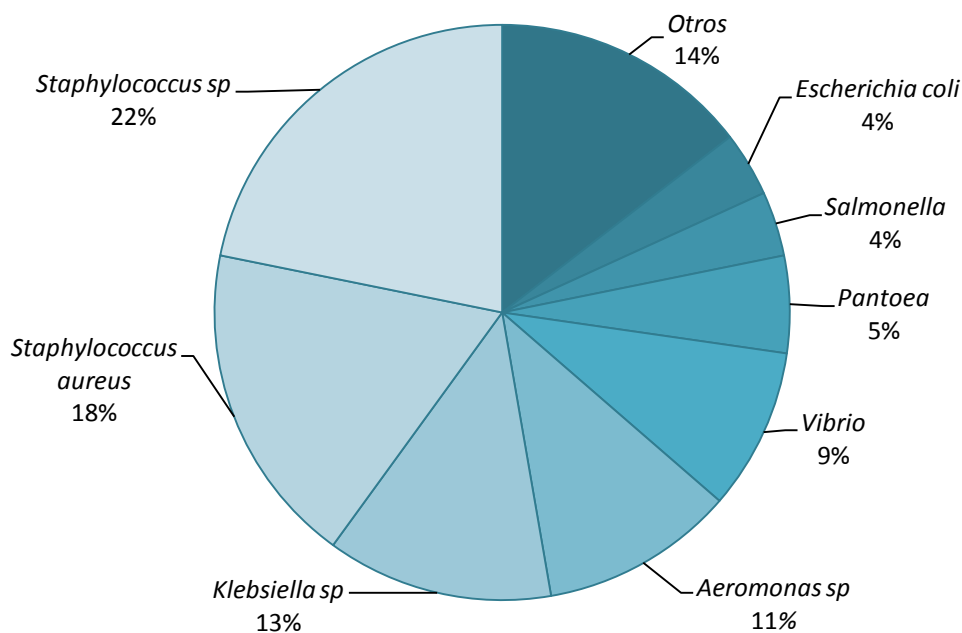


Figura 7. Porcentaje de géneros bacterianos identificadas en las fosas nasales de las hembras anidantes de la especie *L. olivacea* en el ANP Los Cóbano.

De las 20 tortugas muestreadas, las bacterias identificadas que presentaron una mayor frecuencia son *Staphylococcus sp.* con un 22% seguido de *Staphylococcus aureus* con un 18% cabe mencionar que estas bacterias son propias de las mucosas nasales. Entre las bacterias con menor porcentaje 2% se encuentran *Stenotrophomonas*, *Chromobacterium*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Flavimonas*, *Pasteurella*, *Pseudomona aeruginosa* presentadas en la Figura 7 con la categoría de otros con un 14%.

MUESTRA CLOACAL

Las bacterias presentes en las muestras cloacales: *Acinetobacter*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Klebsiella sp.*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Vibrio*.

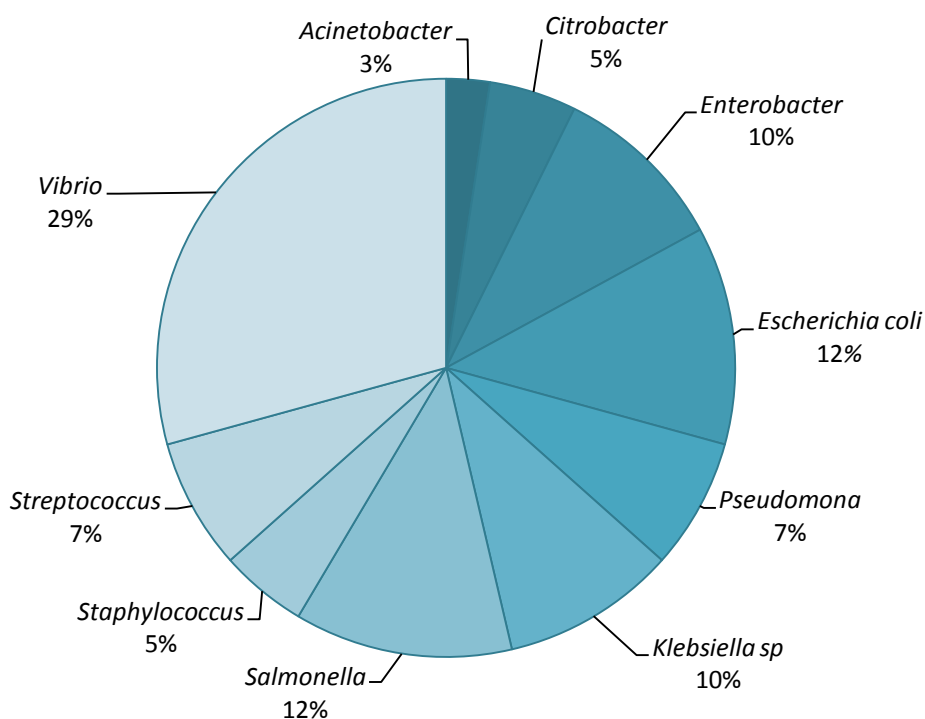


Figura 8. Porcentaje de géneros bacterianos identificadas en la cloaca de las hembras anidantes de la especie *L. olivacea* en el ANP Los Cóbano, Sonsonate, junio - octubre 2012.

De las muestras cultivadas se identificó un total de 10 géneros de bacterias en la cloaca de las tortugas “golfinas” siendo la de mayor porcentaje *Vibrio* con un 29%. *Acinetobacter* representa una menor frecuencia con un 3%. Además; se aislaron bacterias propias del tracto digestivo tales como *Salmonella*, *E. coli*, *Enterobacter* y *Klebsiella* (Figura 8).

5.3 Similitud de los sitios de muestreo

MUESTRA NASAL

El cuadro 5 y figura 9, presenta el índice de similitud de los sitios de muestreo considerando la presencia bacteriana de *Aeromonas sp*, *Klebsiella sp*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus sp* y *Vibrio* en la cavidad nasal de las tortugas *L. olivacea* el cual está dado por un 59.48% comparando las playas de Salinitas con El Cocal, es decir que ambas playas presentan seis tipos de bacterias en común.

El porcentaje de similitud entre los sitios Salinitas con El faro presentan cuatro especies de bacterias en común siendo estas: *Klebsiella sp*, *Pantoea*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus sp* se observa que tiene un menor grado de similitud de un 38.51%,

Cuadro 5. Similitud entre los sitios de muestreo de poblamientos bacterianos nasales, en la tortuga *L. olivacea* en el ANP Complejo Los Cóbano, Sonsonate, junio - octubre 2012.

	El Faro	El Cocal	Salinitas
El Faro			
El Cocal	46.76		
Salinitas	38.51	59.48	

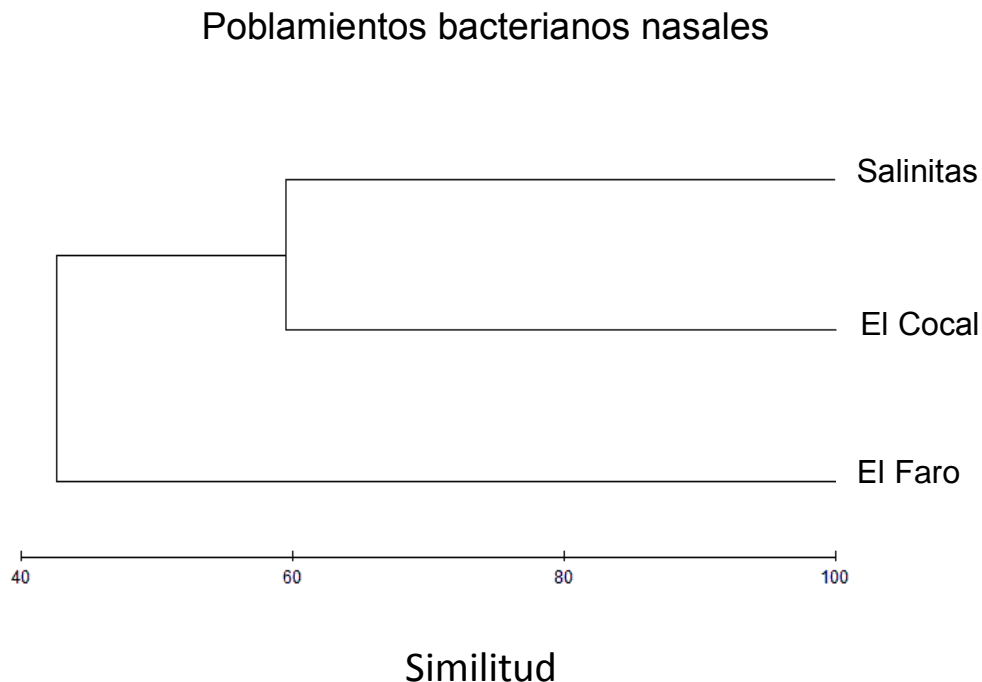


Figura 9. Porcentaje de Similitud entre los sitios de muestreo de poblamientos bacterianos nasales, del ANP Complejo Los Cóbanos, Sonsonate, junio - octubre 2012.

5.3.1 Similitud bacteriana de la muestra nasal en los sitios de anidación.

Existe un grado de similitud en las muestras obtenidas en las cavidades nasales de *L. olivacea* en los tres sitios de muestreo. Entre las más representativas están: *Klebsiella sp* con un 95.49% comparado con *Staphylococcus aureus* esta a su vez presenta una similitud de 97.67% comparada con *Staphylococcus sp* estas tres especies fueron encontradas en las tortugas “golfinas” en los tres sitios de anidación.

A diferencia de los géneros bacterianos *Pasteurella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Chromobacterium*, *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas*; fueron registrados solo en Salinas con una similitud del 100% (Cuadro 6 y Figura 10).

Cuadro 6. Similitud de Bray-Curtis entre bacterias del área nasal de *L. olivacea* en los sitios de muestreo, del ANP Complejo Los Cóbano, Sonsonate, julio-octubre 2012.

	<i>Aeromonas sp</i>	<i>Chromobacterium</i>	<i>Chryseobacterium</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Flavimonas</i>	<i>Klebsiella sp.</i>	<i>Pantoea</i>	<i>Pasteurella</i>	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus sp.</i>	<i>Stenotrophomonas</i>	<i>Vibrio</i>
<i>Aeromonas sp</i>																
<i>Chromobacterium</i>	57.22															
<i>Chryseobacterium</i>	0.00	0.00														
<i>Citrobacter</i>	57.22	100	0.00													
<i>Enterobacter</i>	57.22	100	0.00	100												
<i>Escherichia coli</i>	0.00	0.00	91.36	0.00	0.00											
<i>Flavimonas</i>	0.00	0.00	100	0.00	0.00	91.36										
<i>Klebsiella sp</i>	79.17	43.45	43.45	43.45	43.45	41.73	43.45									
<i>Pantoea</i>	42.69	62.71	62.71	62.71	62.71	70.40	62.71	69.05								
<i>Pasteurella</i>	57.22	100	0.00	100	100	0.00	0.00	43.45	62.71							
<i>P aeruginosa</i>	57.22	100	0.00	100	100	0.00	0.00	43.45	62.71	100						
<i>Salmonella</i>	88.98	66.67	0.00	66.67	66.67	0.00	0.00	71.38	47.74	66.67	66.67					
<i>S aureus</i>	77.51	40.46	40.46	40.46	40.46	46.34	40.46	95.49	71.39	40.46	40.46	67.30				
<i>Staphylococcus sp</i>	75.31	38.97	38.97	38.97	38.97	44.70	38.97	93.17	69.27	38.97	38.97	65.23	97.67			
<i>Stenotrophomonas</i>	57.22	100	0.00	100	100	0.00	0.00	43.45	62.71	100	100	66.67	40.46	38.97		
<i>Vibrio</i>	98.35	58.58	0.00	58.58	58.58	0.00	0.00	80.24	43.45	58.58	58.58	90.62	75.95	73.76	58.58	

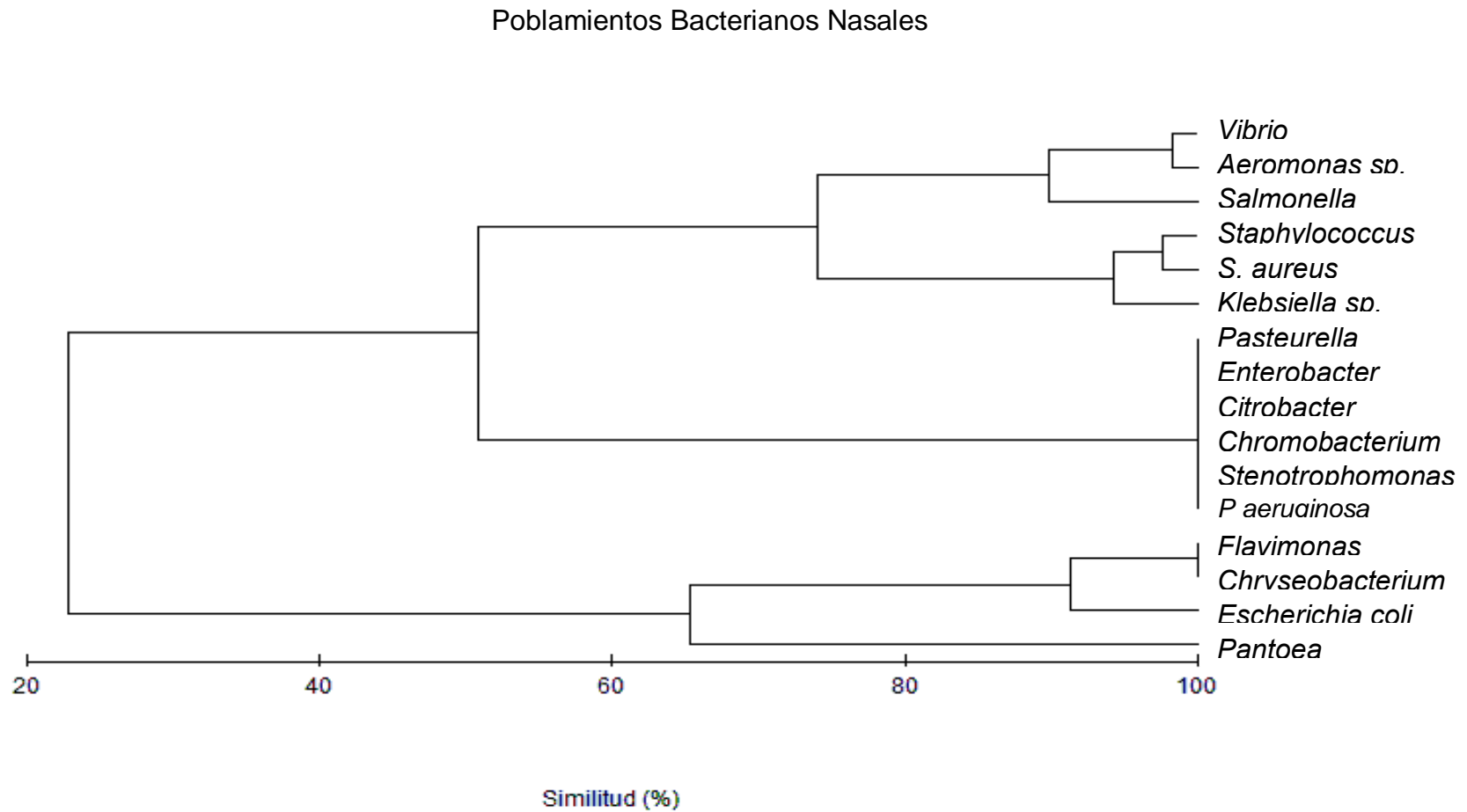


Figura 10. Similitud de muestra nasal de la tortuga *L. olivacea* en los sitios de muestreo, del ANP Complejo Los Cóbanos, Sonsonate, junio - octubre 2012.

MUESTRA CLAOCAL

El grado de similitud entre los sitios de muestreo El cocal, Salinitas y El faro se muestra en el cuadro 7 y figura 11, referente a las muestras cloacales de la tortuga *L. olivacea*, obteniendo un 55.05% de semejanza entre Salinitas y El Cocal, teniendo en común bacterias como *Pseudomona aeruginosa*, *Klebsiella sp*, *Salmonella* y *Vibrio*. El Faro y El Cocal poseen un grado de similitud del 44.30% presentan en común los siguientes géneros: *Salmonella* y *Vibrio* siendo esta ultima la de mayor frecuencia para los tres sitios.

Cuadro 7. Similitud entre los sitios de muestreo de poblamientos bacterianos cloacales, en el ANP Complejo Los Cóbano, Sonsonate, junio - octubre 2012.

	El Faro	El Cocal	Salinitas
El Faro			
El Cocal	44.30		
Salinitas	50.68	55.05	

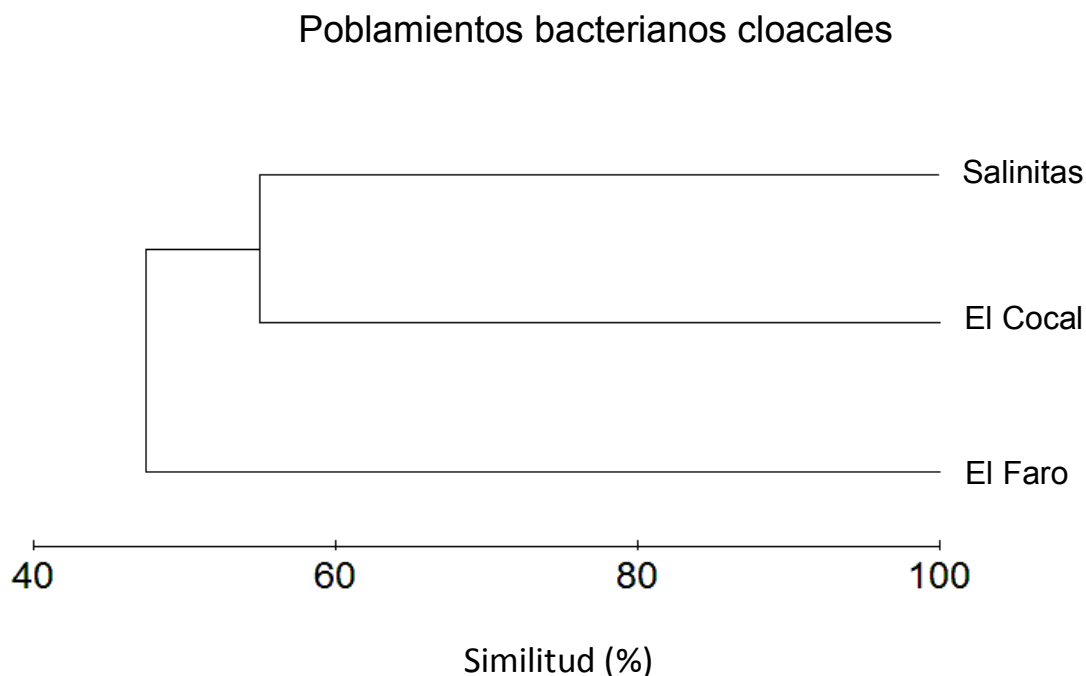


Figura 11. Porcentaje de Similitud entre los sitios de muestreo de poblamientos bacterianos cloacales de *L. olivacea*, en ANP Complejo Los Cóbano, Sonsonate, junio - octubre 2012.

5.3.2 Similitud bacteriana de muestra del área cloacal de *L. olivacea* en los sitios de muestreo.

La similitud entre los sitio de muestreo en relación a las bacterias registradas para las muestras cloacales, muestran que bacterias como *Acinetobacter* y *Citrobacter* tiene una similitud del 91.36%, se registró una similitud del 82.84% entre *Enterobacter* y *Acinetobacter* las cuales solo se registraron en el sitio de muestreo de Salinitas. Estas bacterias son propias de aguas contaminadas o residuales. Otro grupo como *Streptococcus* y *Escherichia coli* tiene un 95.11% de similitud, *Salmonella* y *Vibrio* tiene un 89.05% de similitud en relación a los sitios El Faro y Salinitas (Cuadro 8 y Figura 12).

Cuadro 8. Poblamientos cloacales bacterianos en *L. olivacea*, en ANP Complejo Los Cóbanos, Sonsonate, junio - octubre 2012.

	<i>Acinetobacter</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Klebsiella sp</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Vibrio</i>
<i>Acinetobacter</i>										
<i>Citrobacter</i>	91.36									
<i>Enterobacter</i>	82.84	91.36								
<i>Escherichia coli</i>	58.58	66.00	73.88							
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	62.71	70.40	66.00	51.67						
<i>Klebsiella sp</i>	59.20	66.67	62.71	49.63	95.86					
<i>Salmonella</i>	46.34	52.79	55.64	80.84	79.53	76.89				
<i>Staphylococcus</i>	0.00	0.00	0.00	55.50	0.00	0.00	44.39			
<i>Streptococcus</i>	62.71	70.40	66.00	95.11	54.32	52.07	79.53	59.20		
<i>Vibrio</i>	38.97	44.70	51.00	73.76	69.27	73.07	89.05	44.70	69.27	

Poblamientos bacterianos

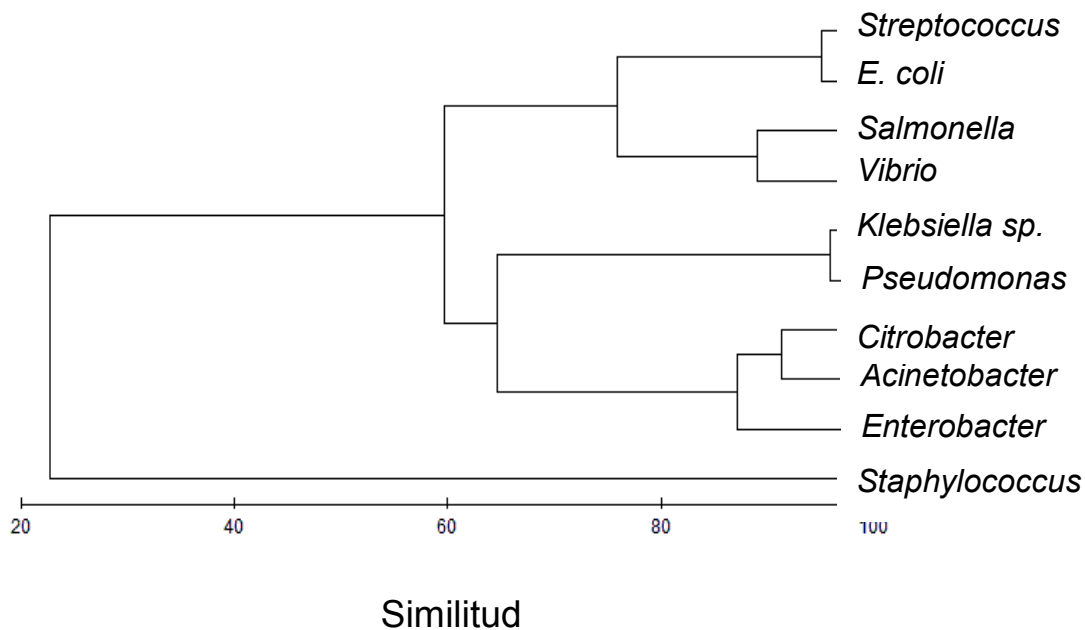


Figura 12. Similitud de muestra cloacal de *L. olivacea* en los sitios de muestreo, del ANP Complejo Los Cóbanos, Sonsonate, junio - octubre 2012.

5.4 Análisis microbiológico de las muestra de agua.

Cuadro 9. Géneros identificados en las muestras de agua en los sitios de muestreo del ANP Complejo Los Cóbanos, Sonsonate.

MUESTRA DE AGUA DE MAR				
N°	Bacterias	Playas		
		El Faro	El Cocal	Salinitas
1	<i>Acinetobacter</i>	-	-	1
2	<i>Aeromonas sp</i>	-	-	1
3	<i>Chryseobacterium</i>	-	2	-
4	<i>Escherichia coli</i>	-	1	-
5	<i>Klebsiella sp</i>	-	-	1
6	<i>Pantoea</i>	-	-	1
7	<i>Providencia sp</i>	-	-	1
8	<i>Stenotrophomonas</i>	-	-	1
9	<i>Vibrio</i>	1	-	2
Total		1	3	8

De los 12 géneros identificados en las muestras de agua de mar de cada uno de los sitios de muestreo en las playas El Faro, Cocal y Salinitas, únicamente el género *Providencia* no fue identificado en las muestras bacterianas de la región nasal y cloacal de las hembras anidantes de *L. olivacea*. Estos géneros son altamente patógenos para los seres humanos y las tortugas marinas además son propias de las aguas. (Cuadro 9).

5.5 ANOVA

Bacterias de área nasal de *L. olivacea* por talla del largo curvo del caparazón

Las diferencia de medias que existen entre las tallas ($P = 0.017$), es mayor de lo esperado comparado con los Grupos Bacterianos identificados. La misma situación se observa en los grupos bacterianos ($P = 0.011$), influidos por las tallas, al realizar las comparaciones de Tallas X Grupos Bacterianos se concluye que las diferencias entre los niveles de Tallas no depende de las Bacterias presentes, por lo que no existen interacciones estadísticamente significativas ($P = 0.065$) entre los grupos analizados de Tallas X Bacterias.

Bacterias de área cloacal de *L. olivacea* por talla del largo curvo del caparazón

Se observan diferencias entre las medias de los tratamientos de Tallas es mayor ($P = 0.004$) de lo que se esperaría comparado con las Bacterias. Las diferencias que existen entre los niveles de bacterias es mayor de lo que cabría esperar en relación a las tallas. Hay una diferencia significativa ($P=0.040$) estadísticamente.

Para los tratamientos: Grupo Bacteriano por Talla de LCC, se concluye con la aceptación de la hipótesis nula ya que existen diferencias estadísticas significativas entre las bacterias encontradas en los intervalos de tallas estudiados.

Sitio de muestreo por Grupos de Bacterias del área nasal de *L. olivacea*

Las diferencias de medias que existen entre los niveles de Sitio ($P = 0.013$), son mayor de lo esperado por efecto de las diferencias entre las Bacterias. La misma situación se observa en los grupos de bacterias ($P = 0.027$), influido por los sitios de muestreo, al realizar las comparaciones de Grupos bacterianos X Sitio se concluye que las diferencias entre los Grupos de bacterias no depende del sitio de muestreo, por lo que no existen interacciones estadísticamente significativa ($P= 0.132$) entre los grupos analizados de Sitio de Muestreo X Grupo Bacteriano.

Sitio de muestreo por Grupos de Bacterias del área cloacal de *L. olivacea*

Se observan diferencias entre las medias de los tratamientos de Sitio es mayor ($P = <0.001$) de lo que se esperaría comparándolo con las Bacterias. La diferencia que existe entre los niveles de bacterias es mayor de lo que cabría esperar entre las diferencias con los sitios. Hay una diferencia significativa ($P = 0.041$) estadísticamente.

Para los tratamientos: Sitios de Muestreo por Grupos Bacterianos, se concluye con aceptar la hipótesis nula ya que existe diferencia significativa en los grupos de bacterias de la especie “golfina” en los sitios de anidación del ANP Complejo los Cóbano.

6 DISCUSION

Es importante recalcar que a la fecha no se cuenta en el país con estudios de la flora bacteria en tortugas marinas, la metodología utilizada durante la investigación se basó en estudios realizados en Costa Rica por Santoro *et al* (2003), para la playa Nancite Parque Nacional Santa Rosa.

La presente investigación se desarrolló durante los meses de junio a octubre del 2012, obteniendo un mayor número de hembras anidantes durante el mes de octubre. Lo cual concuerda con Vásquez *et al* (2009) quien expone que la temporada de anidación para la tortuga “golfina” *L. olivacea* comprende entre los meses de julio a diciembre, con un pico de agosto a octubre.

Chacón (2004) menciona que las hembras Tortuga “golfina” en su estado adulto presentan una longitud del largo del caparazón entre los 60 y 70 cm, en la Figura 5 se observan las tallas promedio de las hembras anidantes estudiadas en el ANP los Cóbano, siendo la talla más representativa el intervalo de 66-68cm.

Se reportan un total de 18 géneros bacterianos, 9 géneros cloacales y 16 géneros en las cavidades nasales un número mayor a lo encontrando por Santoro *et al* (2003), 15 especies bacterianas, 9 géneros bacterianos aislados de la cloaca y 11 género en las cavidades nasales en 45 hembras de *L. olivacea*. Se obtuvieron un total de 8 grupos bacterianos en común de estas se identificaron para ambos sitios anatómicos (cloaca y nasal) *E. coli* y *Pseudomonas* y para región nasal *Staphylococcus aureus*.

De los datos registrados un total de 10 géneros bacterianos aislados en esta investigación no fueron encontrados por Santoro *et al*, (2003); estos son para el área anatómica cloacal *Streptococcus sp.*, y para el área nasal *Chromobacterium sp.*, *Chrysochromobacterium sp.*, *Flavimonas sp.*, *Pantoea sp.*, *Pasteurella sp.*, y *Stenotrophomonas sp.* además; *Klebsiella sp.*, *Staphylococcus sp.* y *Vibrio sp.*,

estos géneros son comunes en aguas saladas, dulces y en el suelo; fueron encontradas en ambas regiones anatómicas; siendo las características de las playas de anidación un factor que influyó en esta diferencia.

Las bacterias identificadas durante el estudio de la flora nasal y cloacal en la tortuga *L. olivacea* fueron *Aeromonas* spp., *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter* spp., *Citrobacter* spp., estos géneros bacterianos fueron identificados durante el estudio en el ANP Complejo Los Cóbano al igual que Santoro *et al* (2003). Playa Nancite Parque Nacional Santa Rosa Costa Rica. Estas bacterias son altamente patógenas, según el estudio de O' Grady & Krause (1999) reportan que estas han sido descritas posibles causantes de enfermedades en tortugas marinas de vida libre principalmente cuando se encuentran en condiciones de estrés o cuando están debilitados.

Otras especies bacterianas identificadas son *E. coli* y *Salmonella* sp., Serrano *et al*, (2012). Menciona que han sido descritas como causantes principales de enfermedades o mortalidad de tortugas, ya que actúan directa o indirectamente, desencadenando patologías graves. En el mismo estudio se planteo que las bacterias causantes de mortandad de tortugas por afecciones pulmonares son *Staphylococcus*, *Vibrio* y *Aeromonas*, estas mismas bacterias estuvieron presentes en las tortugas *L. olivacea* del ANP Los Cóbano.

La mayoría de las bacterias identificadas durante la investigación como *Staphylococcus*, *Vibrio*, *E. coli*, *Salmonella* sp, *Streptococcus* sp y otras Enterobacterias son causantes de enfermedades en humanos, Santoro *et al*, (2003) O' Grady & Krause (1999). Esto podría desencadenar una zoonosis por el consumo de huevos, carne y manipulación de las tortugas.

La mayor concentración de flora bacteriana para los sitios de anidación en los puntos de muestreo en relación a las muestras nasa y cloacal (cuadro 3) se registró en la playa Salinitas y una menor concentración bacteriana en la playa el

Cocal; lo cual puede deberse, a que dicha playa es poco frecuentada por los turistas, sin embargo; la playa Salinitas según un estudio realizado por Molina *et al* (2006) goza de mayor atracción turística ya que está rodeada por una red hotelera la cual atrae a más de 3000 personas al mes, dichos turistas podrían ser fuente importante de contribución a la contaminación e incremento en el número de sedimentos y al aumento de turbidez de las aguas.

7 CONCLUSIONES

- La flora bacteriana de *Lepidochelys olivacea* está dada en su mayoría por bacterias altamente patógenas las cuales son parte de la flora normal, pero que en condiciones de estrés son causantes de enfermedades infecciosas logrando afectar la supervivencia de las poblaciones de las tortugas marinas.
- Por la alta tolerancia de concentración de sal y factores físicos, algunas bacterias de las identificadas forman parte de la composición bacteriana más frecuente identificada en el área de la cloaca y las fosas nasales de las tortugas “golfina” *L. olivacea* durante el estudio.
- Existe un mayor grado de similitud para los sitios de muestreo Salinitas y El Cocal en relación a las bacterias identificadas en ambas áreas anatómicas de la *L. olivacea*.
- Se puede inferir que el tipo y cantidad de bacterias en las tortugas es independiente del tamaño de la tortuga dado los resultados en el análisis de varianza. Las bacterias están distribuidas en el agua que es el hábitat de las tortugas y dependerá de muchos factores el que estén presentes en los individuos marinos.

8 RECOMENDACIONES

- Se deberían realizar más estudios sobre éste tema para conocer como estos microorganismos afectan la supervivencia de las poblaciones de tortugas marinas de vida libre.
- Realizar una investigación profunda de la contaminación microbiana de la arena para conocer si contribuye a la disminución de la viabilidad de los huevos.
- Tener en cuenta al momento de desarrollar estudios de la flora bacteriana en tortugas marinas contar con el apoyo logístico con el fin cubrir una mayor área de muestreo he incrementar el número de muestras para los diferentes análisis y obtener datos más representativos.
- Implementar programas rutinarios para el monitoreo de salud y la identificación de posibles enfermedades infecciosas como parte de sus estudios poblacionales en general.

9 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Alemán M. 2010. La tortuga marina. Disponible en red:

http://redescolar.ilce.edu.mx/redescolar/publicaciones/publi_prodigios/ver_camacho/informac.htm. Consultado: 11-06 de 2011

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

Buitrago J. s.a. Amenazas naturales y antrópicas en tortugas marinas. Disponible en red:

http://www.invemar.org.co/redcostera1/invemar/docs/T01Amenazas_naturales.PDF Consultado: 11-06 de 2011

Carballo, R. y X. Pocasangre, 2007. Composición y estructura de la fauna intermareal de equinodermos en el sistema arrecifal rocoso Los Cóbanos Departamento de Sonsonate, El Salvador. 77 pp.

CIT (secretaría pro tempore de la convención interamericana para la protección y conservación de las tortugas marinas), 2004. Una Introducción a las Especies de Tortugas Marinas del Mundo. Octubre 2004, San José, Costa Rica. 10pp. PDF Disponible en red:

<http://www.iacseaturtle.org/download/EspeciesTortugasMarinasMundoesp.pdf> Consultado: 10-03 de 2011

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

Cortez, L.; S. Jaimes y R. Pérez, 2004. Estudio de las poblaciones de microalgas de las divisiones Chlorophyta, Phaeophyta y Rodophyta de la zona

mesolitoral en la plataforma rocosa de Los Cóbanos, Departamento de Sonsonate, El Salvador. 90 pp.

Cruz, A.T.; A.C. Cazacu y C.H. Allen, 2007. *Pantoea agglomerans*, a Plant Pathogen Causing Human Disease. *Journal of clinical Microbiology*. Houston, Texas. Vol 45, N°.6

Cueto, L.M. y A.P. Hernández, s.a., *Pasteurella multocida*, Departamento de Microbiología. Hospital Universitario Virgen Macarena. Sevilla.

Chacón, D.; J. Sánchez; J.J. Calvo & J. Ash, 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.

Chacón, D.; J. Sánchez; J.J. Calvo & J. Ash, 2007. Manual para el manejo y la conservación de las tortugas marinas en Costa Rica; con énfasis en la operación de proyectos en playa y viveros. 101 pp.

Dueñas, C. 2009. Manual para la incubación artificial de huevos, manejo de neonatos y recopilación de información de hembras anidantes de tortugas marinas en El Salvador. 41 pp.

Eckert, S.A.; Eckert K.A.; Ponganis, P. and Kooyman, G.L., 1989. Diving and foraging behaviour of leatherback sea turtles *Dermochelys coriacea*, *Can. J. Zool.*, 67, p.2834-2840.

Fariñas M.C. s.a. Infecciones por enterobacterias. Disponible en red: <http://ocw.unican.es/ciencias-de-la-salud/enfermedades-infecciosas/materiales-de-clase-1/Tema%208.1.pdf> Consultado: 16-01 de 2015

Fernández M.I.; J.F. Clua, 2003. Fundamentos y técnicas de análisis microbiológicos. Familia Neisseriaceae. Disponible en red: http://sameens.dia.uned.es/Trabajos9/Trab_Publicos/Trab_7/Cardona_Pascual_7/Tabla%201.pdf Consultado:

Gámez, S.; L.J. García Márquez; D. Osorio Sarabia; J.L. Vázquez García & F. Casas, 2007. Patología de las Tortugas Marinas (*Lepidochelys olivacea*) que arribaron a las Playas de Cuyutlán, Colima, México. Disponible en red: <http://www.medigraphic.com/pdfs/vetmex/vm-2009/vm091g.pdf> Consultado: 20-03 de 2011.

García, L. 2011 Principales amenazas para las tortugas marinas. Disponible en red: <http://www.playasandiegoelsalvador.com/la-tortuga-golfina>. Consultado: 11-06 de 2011.

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.

González, M.I.; T.T. Rojas; S.C. Rubalcaba; M.V. Aguilar y I.D. Martínez, 2004. *Aeromonas* sp: patógenos emergentes a considerar en aguas. Revista electrónica de la Agencia de Medio Ambiente Año 4. Disponible en red: <http://ama.redciencia.cu/articulos/6.05.pdf> Consultado: 30-05 de 2013.

Guevara, A.: S. Marilly; M. Oliveros; E. Guevara; M. Guevara & L. Medina, 2007. Sepsis por *Chromobacterium violaceum* pigmentado y no pigmentado: Disponible en red: http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0716-10182007000500010&script=sci_arttext. Consultado: 20-01 de 2015.

- Gutiérrez, D.C.; A.M. Hernández; L.C. Corrales, 2009. *Pseudomonas oryzihabitans*: Disponible en red:
[http://www.unicolmayor.edu.co/invest_nova/NOVA/artREVIS1_NOVA11.p df](http://www.unicolmayor.edu.co/invest_nova/NOVA/artREVIS1_NOVA11.pdf)
Consultado: 25-05 de 2013.
- Gyles, C.L.; J.F. Prescott; G. Songer y C.O. Thoen, 2010. Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals, Fourth Edition. 661 pp.
- Hasbún, C. R. & M. Vásquez, 1995 Proyecto de conservación de la tortuga marina en Barra de Santiago, El Salvador, 1994. Asociación Ambientalista Amigos del Árbol (AMAR). Reporte Final presentado a USFWSF.
- Instituto Geográfico Nacional, 1971. Diccionario Geográfico de El Salvador. Ministerio de Obras Públicas. San Salvador, El Salvador. Tomo II.
- Kirov SM, 1997 Aeromonas and Plesiomonas Species. En Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ, ASM Press, Washington DC, 265-287.
- Koneman, E.W y S.Allen, 2008. Diagnostico microbiológico texto y atlas 6^a ed. Buenos Aires: Medica Panamericana. 1691 pp.
- Lawrence, K. y Needdham, J.R. 1985. Rhinitis in long term captive Mediterranean tortoises (*Testudo graeca* and *Testudo hermanni*). Vet. Rec. 21: 662-664.
- Liles, M.; M. Vásquez; W.A. López; G. Mariona; C.R. Hasbún y J. Seminoff, 2011 Hawksbill turtles *Eretmochelys imbricata* in El Salvador: nesting distribution and mortality at the largest remaining nesting aggregation in the eastern Pacific Ocean.

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

Marcano, J.E., 2006 Amenazas de las tortugas marinas. Disponible en red: <http://www.jmarcano.com/biodiverso/endanger/tortuga/amenaza.html>. Consultado: 15-06 de 2011.

Molina, O. y M. Vásquez, 2006 Línea base de las condiciones biofísicas, socioeconómicas e institucionales del sistema arrecifal de Los Cóbanos, ICMARES/UES.

O'Grady, K. A. y V. Krause. 1999. An outbreak of salmonellosis linked to a marine turtle. Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health. 30: 324-327 Disponible en red: <http://scholar.google.com.br/scholar?q=An%20outbreak%20of%20salmonellosis%20linked%20to%20a%20marine%20turtle%20>.

Orós, J. 2004 Anatomía patológica de reptiles Disponible en red: <http://www.webs.ulpgc.es/apreptil/index.html>. Consultada: 10-06 de 2011.

Pegues D.A, et al: Nontyphoidal salmonellosis. En Tropical Infectious Diseases Principles, Pathogens, & Practice, Churchill Livingstone, Philadelphia, 1999:296-308.

Preseatt, M, John P. Harley y Donald A. Klein, 2004, MICROBIOLOGIA.McGRAW-HILLINTERAMERICANA DE ESPANA, S. A.

Salazar, E.Z. y B. Nieves. s.a. *Acinetobacter spp.*: Aspectos microbiológicos, clínicos y Epidemiológicos. Disponible en red: <http://medicina.ufm.edu/images/e/e6/Acinetobacter.pdf> Consultado 19-12 de 2014

- Sánchez, I.M., s.a., Diversidad microbiana y taxonómica, Departamento de Microbiología. Universidad de Granada. Disponible en red: http://www.diversidadmicrobiana.com/index.php?option=com_content&view=article&id=111&Itemid=141 Consultado 25-05 de 2013
- Sánchez, F. & R. Díaz Fernández. 2007. Características de la Anidación de la Tortuga Verde *Chelonia mydas* (Testudinata: Cheloniidae) en la playa Caleta de los Piojos, Cuba.
- Sandoval, L.X, 2009. Septic shock and multiorgan failure by *Chromobacterium violaceum*, Revista colombiana Salud libre Vol. 4 Disponible en red: http://www.unilibrecali.edu.co/Revista_Colombiana_Salud_Libre/vol_41/choque%20septico%20y%20falla%20multiorganica%20por%20chromobacterium%20violaceum.pdf. Consultado: 03-04 de 2013
- Santoro, M.; C.M. Orrego y G. Hernández Gómez, 2003 Flora Bacteriana Cloacal y Nasal de *Lepidochelys olivacea* (Testudines: Cheloniidae) en el Pacifico Norte de Costa Rica. Disponible en red: <http://www.ots.ac.cr/tropiweb/attachments/volumes/vol54-1/05-SANTORO-Flo.pdf>
- Serrano A., L. Vázquez, C. G. Sánchez, A. J. Basáñez y C. Naval, 2012. Identificación de la flora bacteriana en la tortuga lora (*Lepidochelys kempi*) en el ejido Barra Galindo, Tuxpan, Veracruz, México. Disponible en red: http://investigacion.izt.uam.mx/rehb/publicaciones/22-2PDF/142-146_Serrano.pdf.
- Silva F.O., 2011 *Aeromonas ssp.* Retrato microbiológico. Universidad de Chile; Sociedad Chilena de Infectología Disponible en red: http://www.captura.uchile.cl/bitstream/handle/2250/14000/Silva_Francisco.pdf?sequence=1 Consultado: 30-05 de 2013

Snipes, K.P.; E.L. Biberstein y M.E. Fowler, 1980. A *Pasteurella* spp. Associated with respiratory disease in captive desертtortoises. J. Am. Vet. Med. Assoc. 177: 804-807.

Soria, M.C. 2011 Tortuga Golfina *Lepidochelys olivacea*. Disponible en red: http://www.animalesextincion.es/articulo.php?id_noticia=108
Consultado: 27-06 de 2011.

Tejada, O.L. 2010 El arrecife de Los Cóbano, Patrimonio natural de todos los salvadoreños. Disponible en red: <http://www.cimat.ues.edu.sv/biologia/documentos/IMPORTANCIA%20DE%20LAS%20PLAYA%20DE%20LOS%20COBANOS.pdf>. Consultado: 26-05 de 2011.

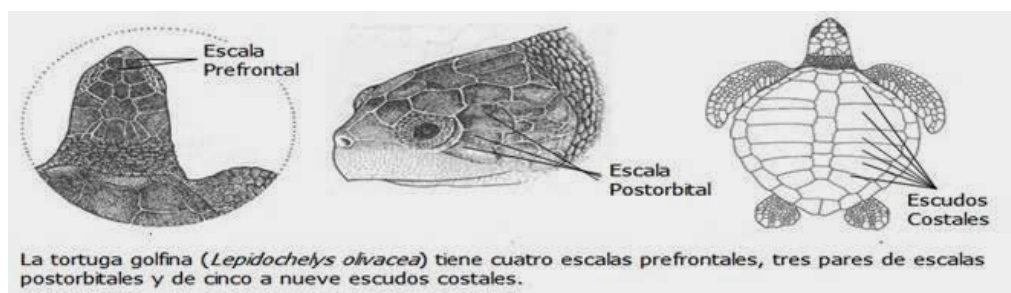
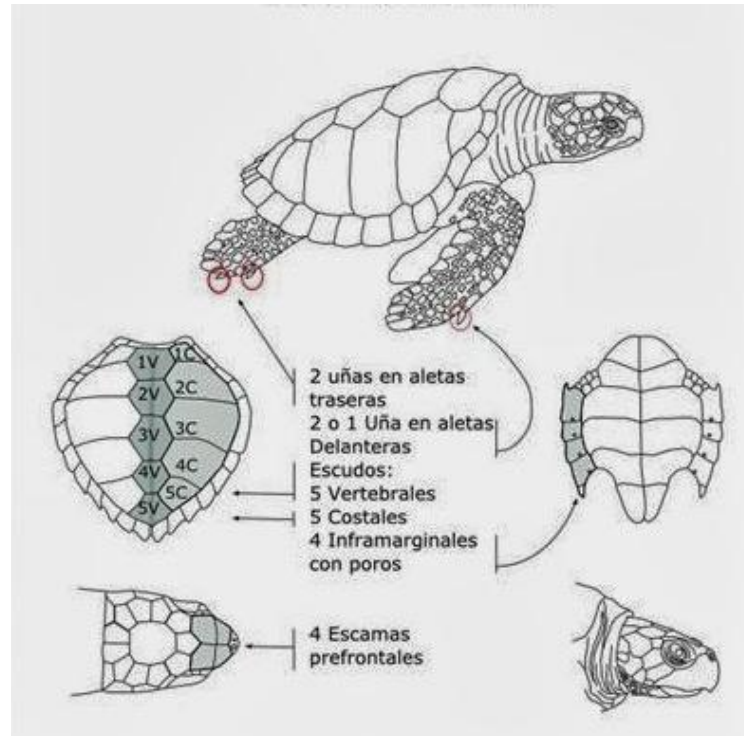
Tortora, G.J.; B.R.Funke y C.L. Case, 2007. Introducción a la microbiología 9^a ed. Buenos Aires: Medica Panamericana. 988 pp.

Vásquez, M.; M. Liles; W. López; G. Mariona, y J. Segovia, 2008 Sea turtle search and conservation, El Salvador. FUNZEL-ICMARES/UES, San Salvador

Vásquez-Jandres, M.V.; M. Liles; W. López; G. Mariona; A. Díaz y J. Segovia, 2009. Investigación y conservación de tortugas marinas El Salvador/ Sea turtle search and conservation, El Salvador. FUNZEL/ICMARES/NFWF/. El Salvador. 60pp.

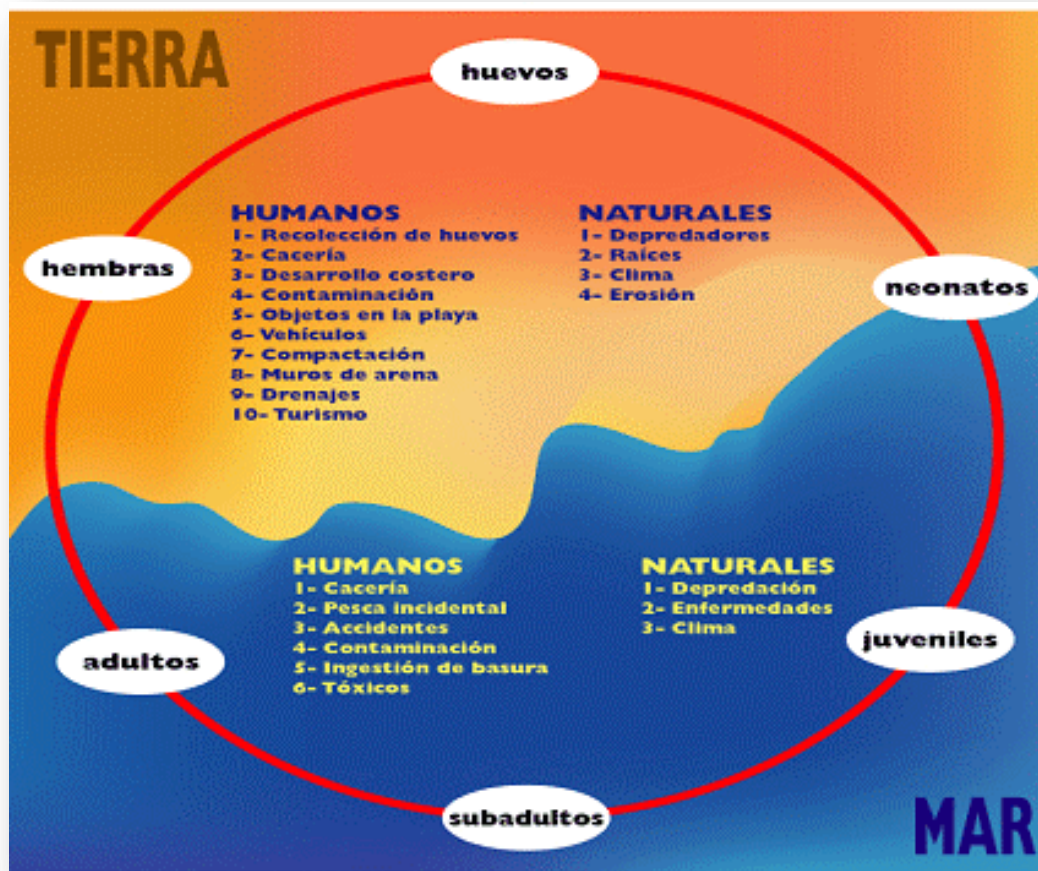
10 ANEXOS

Anexo 1.



Características propias para la determinación de la especie *Lepidochelys olivacea* (Eckert et al, 2000).

Anexo 2



Amenazas que afectan a las tortugas marinas en cada etapa del ciclo de vida, tanto en tierra como en el mar. Tomado de (Chacón, 2004).

Anexo 3

METODOLOGÍA

Metodología de Campo

La fase de campo comprendió los meses de junio a octubre del año 2012. Realizando un total de 31 viajes y colectando un total de 40 muestras bacteriológicas de la fosa nasal y cloaca de 20 hembras anidantes.

Colecta de la muestra



Medio Stuart

Metodología de la Toma de la muestra nasal y cloacal de *Lepidochelys olivacea* en tres playas del ANP Complejo los Cóbanos, Sonsonate, junio - octubre 2012.

Anexo 4

METODOLOGÍA

Conservación y transporte de la muestra



±4°C

Hora _____ Fecha _____
 Especie _____ Playa _____
 Área Anatómica _____
 Nº de placa _____
 Observaciones _____

Las muestras colectadas fueron etiquetadas con los siguientes datos.

Todas las muestras fueron llevadas en menos de 24h al Laboratorio de microbiología de la Escuela de Biología, Universidad de El Salvador.

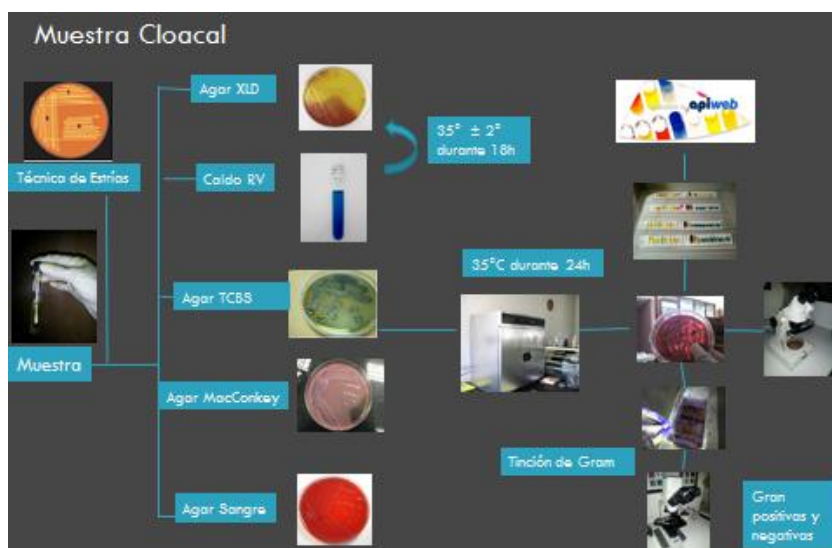
Muestras etiquetadas, conservadas a $\pm 4^{\circ}\text{C}$ y llevadas al laboratorio de Microbiología de la Universidad de El Salvador.

Anexo 5



Metodología de parámetros morfométricos de *Lepidochelys olivacea* en el ANP Complejo los Cóbanos, Sonsonate, junio - octubre 2012.

Anexo 6



Metodología de laboratorio de la muestra cloacal obtenida de *Lepidochelys olivacea* en el ANP Complejo los Cóbanos, Sonsonate, junio - octubre 2012.

Anexo 7



Metodología de laboratorio de la muestra nasal obtenida de *Lepidochelys olivacea* en el ANP Complejo los Cóbanos, Sonsonate, junio - octubre 2012.

ANÁLISIS DE VARIANZA

Two Way Analysis of Variance

Tuesday, February 04, 2014, 12:04:40

Data source: Data 1 in Notebook

General Linear Model

Dependent Variable: Data

Normality Test: Failed (P = <0.001)

Equal Variance Test: Failed (P = <0.001)

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Tallas	3	9.483	3.161	12.644	0.017
Bacterias	14	46.984	3.356	13.424	0.011
Tallas x Bacterias	42	51.703	1.231	4.924	0.065
Residual	4	1.000	0.250		
Total	63	113.734	1.805		

The difference in the mean values among the different levels of Tallas is greater than would be expected by chance after allowing for effects of differences in Bacterias. There is a statistically significant difference (P = 0.017). To isolate which group(s) differ from the others use a multiple comparison procedure.

The difference in the mean values among the different levels of Bacterias is greater than would be expected by chance after allowing for effects of differences in Tallas. There is a statistically significant difference (P = 0.011). To isolate which group(s) differ from the others use a multiple comparison procedure.

The effect of different levels of Tallas does not depend on what level of Bacterias is present. There is not a statistically significant interaction between Tallas and Bacterias. (P = 0.065)

Power of performed test with alpha = 0.0500: for Tallas : 0.854

Power of performed test with alpha = 0.0500: for Bacterias : 0.935

Power of performed test with alpha = 0.0500: for Tallas x Bacterias : 0.509

Least square means for Tallas :

Group	Mean
60-62	0.767
63-65	0.667
66-68	1.300
69-71	0.200

Std Err of LS Mean = 0.127

Least square means for Bacterias :

Group	Mean	SEM
Aeromonas sp	1.500	0.250
Chromobacterium	0.250	0.250
Chryseobacterium	0.250	0.250
Citrobacter	0.250	0.250
Enterobacter	0.250	0.250
Escherichia col	0.500	0.250
Flavimonas	0.250	0.250
Klebsiella sp	1.750	0.250
Pantoea	0.750	0.250
Pasteurella	0.250	0.250
Pseudomonas aer	0.250	0.250
Salmonella	0.500	0.250

Análisis de varianza para las Bacterias de área nasal de *L. olivacea* por talla del largo curvo del caparazón.

Two Way Analysis of Variance

Tuesday, February 04, 2014, 11:02:01

Data source: Data 1 in Notebook

General Linear Model (No Interactions)

Dependent Variable: data

Normality Test: Passed ($P > 0.200$)Equal Variance Test: Passed ($P = 1.000$)

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
talla	3	16.875	5.625	5.651	0.004
bacterias	9	21.225	2.358	2.369	0.040
Residual	27	26.875	0.995		
Total	39	64.975	1.666		

The difference in the mean values among the different levels of talla is greater than would be expected by chance after allowing for effects of differences in bacterias. There is a statistically significant difference ($P = 0.004$). To isolate which group(s) differ from the others use a multiple comparison procedure.

The difference in the mean values among the different levels of bacterias is greater than would be expected by chance after allowing for effects of differences in talla. There is a statistically significant difference ($P = 0.040$). To isolate which group(s) differ from the others use a multiple comparison procedure.

Power of performed test with alpha = 0.0500: for talla : 0.849

Power of performed test with alpha = 0.0500: for bacterias : 0.522

Least square means for talla :

Group	Mean
-------	------

60-62 0.600

63-65 1.800

66-68 1.500

69-71 0.200

Std Err of LS Mean = 0.315

Least square means for bacterias :

Group	Mean
-------	------

Acinetobacter 0.250

Citrobacter 0.500

Enterobacter 1.000

Escherichia col 1.250

Klebsiella sp 1.000

Pseudomonas aer 0.750

Salmonella 1.250

Staphylococcus 0.500

Streptococcus 0.750

Vibrio 3.000

Std Err of LS Mean = 0.499

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparisons for factor: talla

Comparison	Diff of Means	p	q	P	$P < 0.050$
------------	---------------	---	---	---	-------------

Análisis de varianza para las Bacterias de área nasal de *L. olivacea* por talla del largo curvo del caparazón.

Data source: Data 1 in Notebook

General Linear Model

Dependent Variable: data

Normality Test: Failed (P = <0.001)

Equal Variance Test: Failed (P = <0.001)

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Sitio	2	17.253	8.626	25.879	0.013
Bacterias	14	62.646	4.475	13.424	0.027
Sitio x Bacterias	28	39.042	1.394	4.183	0.132
Residual	3	1.000	0.333		
Total	47	125.979	2.680		

The difference in the mean values among the different levels of Sitio is greater than would be expected by chance after allowing for effects of differences in Bacterias. There is a statistically significant difference (P = 0.013). To isolate which group(s) differ from the others use a multiple comparison procedure.

The difference in the mean values among the different levels of Bacterias is greater than would be expected by chance after allowing for effects of differences in Sitio. There is a statistically significant difference (P = 0.027). To isolate which group(s) differ from the others use a multiple comparison procedure.

The effect of different levels of Sitio does not depend on what level of Bacterias is present. There is not a statistically significant interaction between Sitio and Bacterias. (P = 0.132)

Power of performed test with alpha = 0.0500: for Sitio : 0.935

Power of performed test with alpha = 0.0500: for Bacterias : 0.792

Power of performed test with alpha = 0.0500: for Sitio x Bacterias : 0.302

Least square means for Sitio :

Group	Mean
El Faro	0.633
El Cocal	0.467
Salinitas	1.833
Std Err of LS Mean	= 0.147

Least square means for Bacterias :

Group	Mean	SEM
Aeromonas sp	2.000	0.333
Chromobacterium	0.333	0.333
Chryseobacteriu	0.333	0.333
Citrobacter	0.333	0.333
Enterobacter	0.333	0.333
Escherichia col	0.667	0.333
Flavimonas	0.333	0.333
Klebsiella sp	2.333	0.333
Pantoea	1.000	0.333
Pasteurella	0.333	0.333
Pseudomonas aer	0.333	0.333
Salmonella	0.667	0.333
Staphylococcus	3.667	0.236

Análisis de varianza para los Sitio de muestreo por Grupos de Bacterias del área nasal de *L. olivacea*.

Data source: Data 1 in Notebook

General Linear Model (No Interactions)

Dependent Variable: Data

Normality Test: Passed (P = 0.039)

Equal Variance Test: Passed (P = 1.000)

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Sitio	2	26.867	13.433	11.092	<0.001
Bacterias	9	28.300	3.144	2.596	0.041
Residual	18	21.800	1.211		
Total	29	76.967	2.654		

The difference in the mean values among the different levels of Sitio is greater than would be expected by chance after allowing for effects of differences in Bacterias. There is a statistically significant difference (P = <0.001). To isolate which group(s) differ from the others use a multiple comparison procedure.

The difference in the mean values among the different levels of Bacterias is greater than would be expected by chance after allowing for effects of differences in Sitio. There is a statistically significant difference (P = 0.041). To isolate which group(s) differ from the others use a multiple comparison procedure.

Power of performed test with alpha = 0.0500: for Sitio : 0.973

Power of performed test with alpha = 0.0500: for Bacterias : 0.536

Least square means for Sitio :

Group	Mean
El Faro	0.800
El Cocal	0.600
Salinitas	2.700
Std Err of LS Mean = 0.348	

Least square means for Bacterias :

Group	Mean
Acinetobacter	0.333
Citrobacter	0.667
Enterobacter	1.333
Escherichia col	1.667
Pseudomonas aer	1.000
Klebsiella sp	1.333
Salmonella	1.667
Staphylococcus	0.667
Streptococcus	1.000
Vibrio	4.000
Std Err of LS Mean = 0.635	

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparisons for factor: Sitio

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0.050
Salinitas vs. El Cocal	2.100	3	6.034	0.001	Yes

Análisis de varianza para los Sitio de muestreo por Grupos de Bacterias del área cloacal de *L. olivacea*.