UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO
División Académica de Ciencias Biológicas
Laboratorio de Microbiología

Caracterización bacteriana de las heces fecales del manatí (*Trichechus manatus manatus* Linnaeus, 1758) en cautiverio en la División Académica de Ciencias Biológicas.

TESIS

Tesis que para optar por el título de
Licenciado en Ecología

Presenta

Adolfo López Hernández

Director:
M. en C. Lucero Vázquez Cruz

Villahermosa, Tabasco Septiembre 2013

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México

Caracterización bacteriana de las heces fecales del manatí (Trichechus manatus manatus Linnaeus, 1758) en cautiverio en la División Académica de Ciencias Biológicas.

Por Adolfo López Hernández

CANTIDAD DE PALABRAS 9716
HORA DE ENTREGA 04-JUL-2025 03:40P. M.
NÚMERO DE IDENTIFICACIÓN DEL TRABAJO 117072080

Caracterización bacteriana de las heces fecales del manatí (Trichechus manatus manatus Linnaeus, 1758) en cautiverio en la División Académica de Ciencias Biológicas.

INFORME DE ORIGINALIDAD

18%
ÍNDICE DE SIMILITUD

FUENTES PRIMARIAS

1	www.scielo.org.pe Internet	558 palabras —	6%
2	ri.ujat.mx Internet	321 palabras —	4%
3	smb.org.mx Internet	137 palabras —	2%
4	www.docstoc.com Internet	76 palabras —	1%
5	www.uv.mx Internet	75 palabras —	1%
6	www.scielo.org.mx Internet	51 palabras —	1%
7	pt.scribd.com Internet	48 palabras —	1%
8	www.scielo.cl Internet	46 palabras —	1%
9	link.springer.com Internet	30 palabras —	< 1%

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México

10	archive.org Internet	29 palabras — < 1%
11	cybertesis.unmsm.edu.pe Internet	26 palabras — < 1%
12	baadalsg.inflibnet.ac.in Internet	24 palabras — < 1%
13	doczz.net Internet	24 palabras — < 1%
14	zh.scribd.com Internet	23 palabras — < 1%
15	hmong.es Internet	22 palabras — < 1%
16	www.redalyc.org Internet	20 palabras — < 1%
17	eprints.uanl.mx Internet	19 palabras — < 1%
18	manatipr.org Internet	17 palabras — < 1%
19	vdocuments.mx Internet	17 palabras — < 1%
20	pt.slideshare.net Internet	14 palabras — < 1%
21	www.dspace.uce.edu.ec Internet	14 palabras — < 1%
22	www.laopinion.com Internet	14 palabras — < 1%

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México

23	www.cofupro.org.mx Internet	13 palabras — < 1%
24	1library.co Internet	12 palabras — < 1%
25	es.slideshare.net Internet	12 palabras — < 1%
26	iefectividad.conamp.gob.mx Internet	12 palabras — < 1%

EXCLUIR CITAS	ACTIVADO	EXCLUIR FUENTES	DESACTIVADO
EXCLUIR BIBLIOGRAFÍA	ACTIVADO	EXCLUIR COINCIDENCIAS	< 12 PALABRAS

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México

"2013, CENTENARIO LUCTUOSO DE FRANCISCO I. MADERO Y JOSÉ MARÍA PINO SUÁREZ"

AGOSTO 02 DE 2013

C. ADOLFO LOPEZ HERNANDEZ
PAS. DE LA LIC. EN ECOLOGIA
P R E S E N T E

En virtud de haber cumplido con lo establecido en los Arts. 80 al 85 del Cap. III del Reglamento de titulación de esta Universidad, tengo a bien comunicarle que se le autoriza la impresión de su Trabajo Recepcional, en la Modalidad de Tesis denominado: **"CARACTERIZACION BACTERIANA DE LAS HECES FECALES DEL MANATÍ (TRICHECHUS MANATUS LINNAEUS, 1758) EN CAUTIVERIO EN LA DIVISION ACADEMICA DE CIENCIAS BIOLOGICAS"**, asesorado por la M. en C. Lucero Vázquez Cruz sobre el cual sustentará su examen profesional, cuyo jurado está integrado por la M. en C. Rosa Martha Padrón López, Dr. León David Olivera Gómez, M. en C. Darwin Jiménez Domínguez, M. en C. Ma. Guadalupe Rivas Acuña y M. en C. Leonardo Cruz Rosado.

A T E N T A M E N T E
ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE

M. EN C. ROSA MARTHA PADRÓN LÓPEZ
DIRECTORA

UJAT
DIVISION ACADEMICA DE CIENCIAS BIOLOGICAS
DIRECCION

Cc.p.- Expediente del Alumno.
Archivo.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

KM. O.5 CARR. VILLAHERMOSA-CÁRDENAS ENTRONQUE A BOSQUES DE SALOYA
Tel. y Fax (993) 354-4308 y 358-1579 E-mail: direccion.dacbiol@ujat.mx
Usar papel reciclado economiza energía, evita contaminación y despilfarro de agua y ayuda a conservar los bosques

CARTA AUTORIZACIÓN

El que suscribe, autoriza por medio del presente escrito a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco para que utilice tanto física como digitalmente el Trabajo Recepcional en la modalidad de Tesis denominado: **"CARACTERIZACION BACTERIANA DE LAS HECES FECALES DEL MANATÍ (TRICHECHUS MANATUS LINNAEUS, 1758) EN CAUTIVERIO EN LA DIVISION ACADEMICA DE CIENCIAS BIOLOGICAS",** de la cual soy autor y titular de los Derechos de Autor.

La finalidad del uso por parte de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco el Trabajo Recepcional antes mencionada, será única y exclusivamente para difusión, educación y sin fines de lucro; autorización que se hace de manera enunciativa más no limitativa para subirla a la Red Abierta de Bibliotecas Digitales (RABID) y a cualquier otra red académica con las que la Universidad tenga relación institucional.

Por lo antes manifestado, libero a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco de cualquier reclamación legal que pudiera ejercer respecto al uso y manipulación de la tesis mencionada y para los fines estipulados en éste documento.

Se firma la presente autorización en la ciudad de Villahermosa, Tabasco el Día 02 de Agosto de 2013.

AUTORIZO

ADOLFO LOPEZ HERNANDEZ

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México

DEDICATORIA

A mi madre Marilyn, gracias por la vida y por los sacrificios que hiciste por mi cuando era muy chico para que yo saliera adelante, aunque no estemos mucho en contacto gracias mami ¡Te quiero mucho!

A Elodia Hernández Ramírez y Adolfo López León han sido para mí unos segundos padres excelentes. Gracias por guiar mi vida con energía y alegría, porque esto ha hecho de mí una gran persona. Agradezco humildemente todos los esfuerzos que realizaron, en los momentos más difíciles y más felices a lo largo de mi vida, para que yo pudiera alcanzar lo más preciado… ¡Los quiero mucho!

A mis hermanos, Nere, Baltin, Bene, Robert y a Ana, por sus cariños que me brindaron de niño y hasta el momento, por aconsejarme y brindándome su apoyo incondicional y estar ahí conmigo en cualquier momento de mi vida. Así como también y no por menos importante, a Margarito por ayudarme.

A mis hermanos de sangre, Laura, Yunith y Nolberto, por apoyarme en esta etapa de mi vida y por el cariño que me tienen.

A mi novia: Cynthia, quien me ha brindado su apoyo incondicional y ha estado conmigo siempre en momentos difíciles y alegres. Gracias por tus consejos y aportaciones en este trabajo, te agradezco por tu inmensa paciencia en todo momento y por amarme tanto como yo a ti, estar contigo ha sido lo mejor que me ha pasado en la vida, ¡Te Amo Cyn!

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México

AGRADECIMIENTOS

¡Es muy difícil expresar…! en solo unas líneas mis agradecimientos hacia aquellas personas que me apoyaron durante este tiempo. Porque gracias a sus enseñanzas, guía, confianza y comprensión he llegado a realizar unos de los anhelos de mi vida que marca el término de esta etapa, quiero expresar un profundo agradecimiento a quienes con su ayuda me alentaron a lograr esta hermosa realidad.

A la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco – División Académica de Ciencias Biológicas (DACBiol), por haberme formado profesionalmente, y en particular al Laboratorio de Microbiología por las facilidades otorgadas en la realización de este proyecto. Para todos mis compañeros de laboratorio Tania, Dona, Dulce, Gloria, Pablo, Emanuel, Lalo, Darío y Fredy por su valiosa amistad en todo momento que convivimos.

Mi más sincero agradecimiento a mi directora de tesis, la M. en C. Lucero Vázquez Cruz, por haberme dado la confianza para la realización de este proyecto, por su dedicación, compromiso y apoyo incondicional. Así como la disponibilidad y paciencia para llegar al término de esta tesis, gracias por haberme guiado en todo momento, con sus sabios consejos y haber sido un apoyo tanto a nivel profesional como personal.

A la manatí que se encuentra confinada en la Unidad de Rehabilitación de Crías Huérfanas de Manatí de Tabasco, en las instalaciones de la División Académica de Ciencias Biológicas – UJAT, así como al personal que labora en dicha instalación, que me brindaron su apoyo y amistad desde la primera vez que visite la instalación.

Al comité revisor de tesis: M. en C. Rosa Martha Padrón López, Dr. León David Olivera Gómez, M. en C. Darwin Jiménez Domínguez, M. en C. Ma. Guadalupe Rivas Acuña y M. en C. Leonardo Cruz Rosado, por las sugerencias y observaciones de redacción, que permitieron enriquecer y mejorar este trabajo.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México

Agradezco con admiración y respeto a la M. en C. María Leandra Salvadores Baledón, por sus sabios conocimientos dentro de clases y fuera de ellas, así como el apoyo que me brindaba para terminar este trabajo.

Agradezco de todo corazón a Ofelia, Lupita y Soco por brindarme su cariño, son las mejores personas que conozco. ¡Las Quiero!

A mi tío Clemente; por sus consejos que siempre me alentaban para seguir adelante y quien siempre me decía que no me importara que la gente hablara mal de mí que no le diera importancia, gracias por escucharme y orientarme.

A mis compañeros de generación que siempre nos reuníamos en el círculo para planear lo de la semana, gracias Aby, Focil, Magdis, Alina, Fati, Cecy, Luis, Saúl, a los narinas (Alejandro y Diego), Gonzalo, Iván, Macaco, Pepe, Negro y a Javier, por los mejores momentos, aunque ya no estemos en contacto continuo ¡Gracias Por Esos Momentos!

Por último, quisiera agradecer también a todas aquellas personas que no he nombrado y han puesto de su parte ayudando en la realización de este trabajo de un modo u otro.

"La minoría de edad es la incapacidad de servirse del propio entendimiento sin la dirección del otro"

Emmanuel Kant

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México

CONTENIDO

Capítulo I. Proyecto de tesis.....1

1. Introducción.....2

2. Antecedentes.....4

3. Justificación.....7

4. Objetivos.....9

Objetivo general.....9

Objetivo especifico.....9

5. Materiales y métodos.....10

Área de estudio.....10

Toma y transporte de muestras.....11

Aislamiento y purificación.....12

Identificación taxonómica.....14

Conservación de las cepas.....19

Análisis de Resultados.....19

6. Literatura Citada.....22

Capítulo II. Articulo-Revista Peruana de Biología.....26

Título. Flora bacteriana de las heces fecales de una cría de manatí en rehabilitación.....27

Resumen.....27

Introducción.....29

Materiales y métodos.....32

Resultados y Discusión.....34

Conclusión.....40

Literatura Citada.....41

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México

Figuras

Figura 1. Área de estudio (Elaborado por: Marcelino Peralta Gamas)..... 10

Figura 2. Estanque de plástico donde se mantenía al manatí (*Trichechus manatus manatus* Linnaeus, 1758) al inicio de este estudio..... 11

Figura 3. Terminología estándar para la caracterización de la Unidad Formadora de colonia (Winn *et al*., 2008). 13

Figura 4. Esquema general de la técnica de tinción de Gram. 14

Figura 5. Galería API NE (Biomérieux). a) Pruebas negativas; b) Pruebas positivas..... 18

Figura 6. Galería API E (Biomérieux). a) Pruebas negativas b) Pruebas positivas..... 18

Tablas

Tabla 1. Pruebas bioquímicas utilizadas en la galería del sistema API 20 NE (Biomérieux®)..... 15

Tabla 2. Lectura de los diferentes pruebas bioquímicas para la identificación de bacilos Gram negativos no fermentadores de lactosa (API 20 NE). 15

Tabla 3. Lectura de las diferentes pruebas bioquímicas para la identificación de bacilos Gram negativos utilizando la galería del sistema API 20 E (Biomérieux®)..... 16

Tabla 4.Especies bacterianas que se han reportado en algunos mamíferos marinos..... 20

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México

Capítulo I. Proyecto de tesis

Capítulo I

1. Introducción

Los manatíes son mamíferos adaptados para vivir en el agua. Forman parte del orden o grupo zoológico conocido como Sirenia, conformado por cinco especies recientes, de las cuales sólo sobreviven cuatro. La especie *Hydrodamalis gigas* o vaca marina de Steller, se extinguió sólo 27 años después de su descubrimiento en 1741. Los otros miembros del mismo orden son: el manatí del Caribe *Trichechus manatus,* el manatí del Amazonas *Trichechus inunguis,* el manatí Africano *Trichechus senegalensis,* y el dugong del océano Indo-pacífico *Dugong dugong*.

En América existen dos especies: el manatí del Caribe y el del Amazonas. El manatí del Caribe se distribuye desde Florida, en Estados Unidos, hasta Brasil, en América Sur, incluidos México, América Central y las Antillas mayores (Lefebvre *et al,* 2001) e incluye dos subespecies; la de Florida y la Antillana. La especie Amazónica más pequeña, se distribuye en el río Amazonas en Brasil, Guyana, Colombia, Perú y Ecuador. En el continente africano se encuentra la especie, manatí Africano que se distribuye en los ríos y las costas del oeste de África, desde Senegal hasta Angola. El dugong, se distribuye a lo largo de las costas del océano Índico, desde el este de África hasta Australia y la costa suroeste del océano Pacífico (Morales y Olivera, 1992).

En México existe información disponible de la subespecie Antillana (*T. manatus manatus*) en relación a aspectos ecológicos y de conservación (Lluch *et al.,* 1965; Colmenero y Hoz, 1986; Morales *et al.,* 2000; SEMARNAT, 2001; Olivera-Gómez y Mellink *et al.,* 2005), estudios parasitológicos (Hernández, 2008) por mencionar algunos. En relación a investigaciones con el comportamiento e identificación microbiana aún son escasos.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México

Las bacterias actualmente se utilizan como indicadoras potenciales de contaminación, debido a la importancia que tienen en la salud humana y/o animal y en los ecosistemas acuáticos. Se han identificado a *Aeromonas, Bacillus, Bacteroides, Citrobacter, Corynebacterium, Edwardsiella, Enterobacter, Escherichia, Eubacterium, Fusobacterium, Klebsiella, Lactobacillus, Pasteurella, Plesiomonas, Proteus, Pseudomonas, Salmonella, Serratia, Staphylococcus* y *Vibrio* en heces fecales de algunos mamíferos; lobo marino, delfines, ballenas, focas y dugones.

Algunas de ellas se han reportadas como parte de la flora normal en organismos endotermos que además son consideradas como bacterias oportunistas, esto quiere decir que pueden causar algunas enfermedades como infecciones urinarias, septicemias, meningitis, infecciones sistemáticas, infecciones nosocomiales, infecciones pulmonares (Algorta, 2004; García y Rodríguez, 2010; Marsh *et al.,* 2011).

En mamíferos marinos se ha reportado a la familia *Enterobacteriaceae* como una de las principales colonizadoras del tubo digestivo. Esta familia se distribuye ampliamente en la naturaleza; tierra, agua, sobre plantas y como lo indica su nombre son parte del tubo digestivo de seres humanos y animales (Winn *et al.,* 2008).

Algunas de las especies que lo conforman se reportan como patógenas en el hombre como; *Escherichia coli, Klebsiella, Enterobacter, Salmonella*, por mencionar algunas de ellas, estas pueden producir desde una clásica diarrea hasta diarrea con sangre que puede llegar a causar la muerte si no se atiende oportunamente.

Debido a lo antes señalado esta investigación, se planteó el objetivo de caracterizar a la flora bacteriana en muestras rectales de un manatí en cautiverio (DACBiol), con la finalidad de conocer su microbiota, y aportar información para su rehabilitación.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México

2. Antecedentes

Estudios realizados con mamíferos en cautiverio

Con la finalidad de conocer los riesgos de transmisión de enfermedades entre humanos y delfines en Carolina del Norte y Texas, Buck *et al*., (2006), analizaron muestras anales y de heces fecales en delfines nariz de botella en cautiverio que se encontraban en el laboratorio marino de la ciudad de Kansas. La identificación la realizaron por el sistema miniaturizado por pruebas bioquímicas convencionales API 20 NE y API-Estafilococos. Estos autores aislaron 1,871 cepas, entre las más abundantes fueron *Achromobacter, Acinetobacter, Alcaligenes, Moraxella, Oligella, Pasteurella, Vibrio, Klebsiella pnuemoniae, Proteus vulgaris, Pseudomonas, Providencia alcalifaciens, Serratia liquifaciens, Serratia odorífera, Staphylococcus aureus y Citrobacter freundii,* que pueden representar parte normal de la microflora comensal de delfines silvestres y saludables.

Estudios con mamíferos en vida libre

La presencia de *Edwardsiella tarda,* en el intestino delgado se ha reportado como patógena en diferentes mamíferos marinos (león marino, marsopa, cetáceo y manatí) Coles *et al*., (1978), esto a partir de animales encontrados muertos. Estos autores tomaron muestras de exudados peritoneales de cada animal y las inocularon en 5% de agar de sangre y agar Mac Conkey; las cepas fueron identificadas utilizando 16 pruebas bioquímicas. Los aislamientos revelaron la presencia de *E. tarda* en todos los animales analizados, los autores sugieren que la muerte de estos organismos fue causada por *E. tarda* debido a que es considerada una bacteria oportunista, que puede invadir tanto a organismos sanos como enfermos, además se ha reportado en tortugas, peces, cocodrilos y otros organismos marinos como parte de su flora intestinal.

González *et al*., (2010), determinaron la frecuencia de aislamiento de la familia *Enterobacteriaceae* en heces de lobo marino común (*Otaria flavescen*)

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco México

pertenecientes a una colonia urbana de 38 ejemplares, situada en la ribera del río Valdivia al sur de Chile. Colectaron 30 muestras de heces, que fueron sembradas en Agar Mac Conkey, Agar XLD (Xilosa-Lisina–Desoxicolato), e incubadas a 37°C por 24 horas, realizando pruebas de oxidasa para diferenciar a bacilos Gram negativos, perteneciendo a los géneros de *Pseudomonas, Aeromonas, Plesiomonas* y *Vibrios*. La identificación fue realizada por pruebas bioquímicas convencionales, entre las cuales se identificaron a *E. tarda, Escherichia coli, Hafnia alvei, Morganella morganii, Proteus mirabilis, Klebsiella pneumoniae, Serratia rubidea, Providencia rustigianii* y *Citrobacter braakii*, de las cuales las primeras tres especies son bacterias oportunistas y forma parte de la microbiota intestinal del lobo marino sudamericano.

Ogawa *et al*., (2010), realizaron estudios en la flora intestinal, (piel y heces fecales) de ballenas (*Balaenoptera acutorostrata*). En los últimos años, el análisis de secuencia de 16 ARNr se ha convertido en el método estándar para la identificación de las bacterias.

Las muestras de heces fecales las suspendieron en solución salina y realizaron vaciados en placas con agar. El medio contenía 2% de agar, que prepararon para cada uno de los siguientes: caldo nutritivo, caldo GAM, MRS y Desoxicolato. Las placas de agar las incubaron a 35°C por una semana. Después de su incubación las colonias fueron seleccionadas al azar. Las células aisladas fueron identificadas por el programa BLASTIN para determinar la homología que había con otros organismos y estas las almacenaron a 10°C. A través de pruebas moleculares de la secuencia 16 ARNr obtuvieron la identificación de *Enterococcus faecalis, Enterobacter cloacae, E. coli, Clostridium* sp. y *Edwardsiella ictaluri*, las cuales forman parte de la microbiota intestinal de la ballena.

Actualmente en la Antártida se han estudiado a focas como reservorios de *Salmonella* sp., debido a que recibe las aguas residuales producto de las actividades humanas con lo que se introduce una gran cantidad de bacterias

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México

patógenas. Vigo *et al*., (2011), determinaron la presencia de *Salmonella entérica* en mamíferos marinos de la Antártida como es el caso de la foca Weddell (*Leptonychotes weddllii*) y el lobo marino antártico (*Artocephalus gazella*, comprobando su relación genética. Las muestras de heces fecales de los mamíferos marinos se inocularon en caldo de Selenito e incubadas por 24 h. a 37°C. El aislamiento fue realizado en agar Hektoen y confirmadas por pruebas bioquímicas convencionales. Los resultados obtenidos se compararon con cepas de *S. entérica*, provenientes de focas y de alimentos contaminados. Esta comparación reveló que existe una relación genómica entre las cepas aisladas y por lo tanto puede indicar, a que estas bacterias entéricas sean introducidas y posiblemente causar zoonosis.

Fernández *et al*., (2011), identificaron bacterias bioquímicamente a partir de muestras aisladas en el cerebro, pulmón, hígado y riñón en la ballena picuda (*Ziphius cavirostris*). Los aislamientos fueron identificados por métodos moleculares. El gen analizado 16S ARNr reveló para las cuatro aislamientos fueron identificadas genotípicamente con el 99.9 % similar al tipo de cepa de *C. freundii*. La especie *Photobacterium* fue identificada en hígado y pulmón. Estos autores consideraron dos posibilidades para la fuente y la ruta de infección. El primero es una infección pulmonar fetal debido a la aspiración de líquido amniótico contaminado durante el parto. La segunda es una transmisión vertical de la infección con *C. freundii* y *C. koseri.* El reconocimiento de las enfermedades bacterianas en mamíferos marinos vivos con frecuencia representa un reto. Esto es aún más difícil en los cetáceos varados que se descomponen y no se cuentan con datos clínicos. Por lo tanto, la necropsia y el análisis de laboratorio son la única manera para determinar la causa de la muerte.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México

3. Justificación

El manatí de las Antillas *T. manatus manatus* es una especie declarada en peligro de extinción y esto se debe a los fuertes cambios que en la actualidad ha sufrido el hábitat del manatí Antillano a lo largo de las costas y ríos de México, América Central, Colombia, Venezuela y Brasil.

Las fuertes alteraciones de su hábitat están relacionadas con diversas actividades humanas. El desarrollo ha hecho que se incremente la contaminación por desechos orgánicos e industriales y por ruido (Morales-Vela y Olivera-Gómez, 1992).

La mayor parte de los estudios realizados en México sobre el Orden sirenia, se han enfocado principalmente a aspectos demográficos, de conservación y aspectos genéticos, sin embargo son escasos o no se encuentran registrados estudios donde se evalué el comportamiento de los microorganismos (bacterias, hongos, virus) en animales de vida libre y cautiverio.

Por lo tanto se considera que estudiar la presencia de bacterias patógenas es importante para la salud pública y principalmente para los organismos, debido a que pueden causar cuadros clínicos severos. Algunos estudios se han enfocado en la identificación de bacterias patógenas como: *Escherichia coli, Salmonella, Shigella, Aeromonas, Vibrio* entre otras, principalmente aquellas de la familia *Enterobacteriaceae*.

Debido a lo anterior se considera importante monitorear la flora bacteriana en un manatí en cautiverio, debido a que se genera conocimiento de las especies presentes en condiciones normales y el papel que juegan los microorganismos en infecciones. Lo anterior con el objetivo de poder prevenir enfermedades y en su caso aplicar tratamientos de una manera más directa y económica.

Esta investigación pretende caracterizar e identificar a especies bacterianas presentes en muestras rectales de un manatí en cautiverio en la División Académica de Ciencias Biológicas, lo cual nos permitirá conocer su microbiota y

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México

como posible reservorio de bacterias patógenas. A su vez este estudio aportara información para la rehabilitación del manatí y permite evaluar, si los resultados son los adecuados para una futura liberación del individuo y para la validación de las medidas sanitarias.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México

4. Objetivos

Objetivo general

Caracterizar la flora bacteriana a partir de muestras rectales de un manatí *Trichechus manatus* en cautiverio en la División Académica de Ciencias Biológicas, UJAT.

Objetivo especifico

Aislar e identificar las cepas bacterias procedentes de hisopado rectal de un manatí en cautiverio.

Determinar la presencia del género *Salmonella* en muestras de hisopado rectal de un manatí en cautiverio.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México

5. Materiales y métodos

Área de estudio

El manatí se encuentra en cautiverio en la Unidad de Rehabilitación de Crías Huérfanas de Manatí de Tabasco, en las instalaciones de la División Académica de Ciencias Biológicas - UJAT, ubicada en la carretera Villahermosa- Cárdenas km 0.5, Tabasco, México, unidad piloto experimental que surge como apoyo al programa de Acción para la Conservación de la especie manatí (PACE-Manatí)(Figura 1).

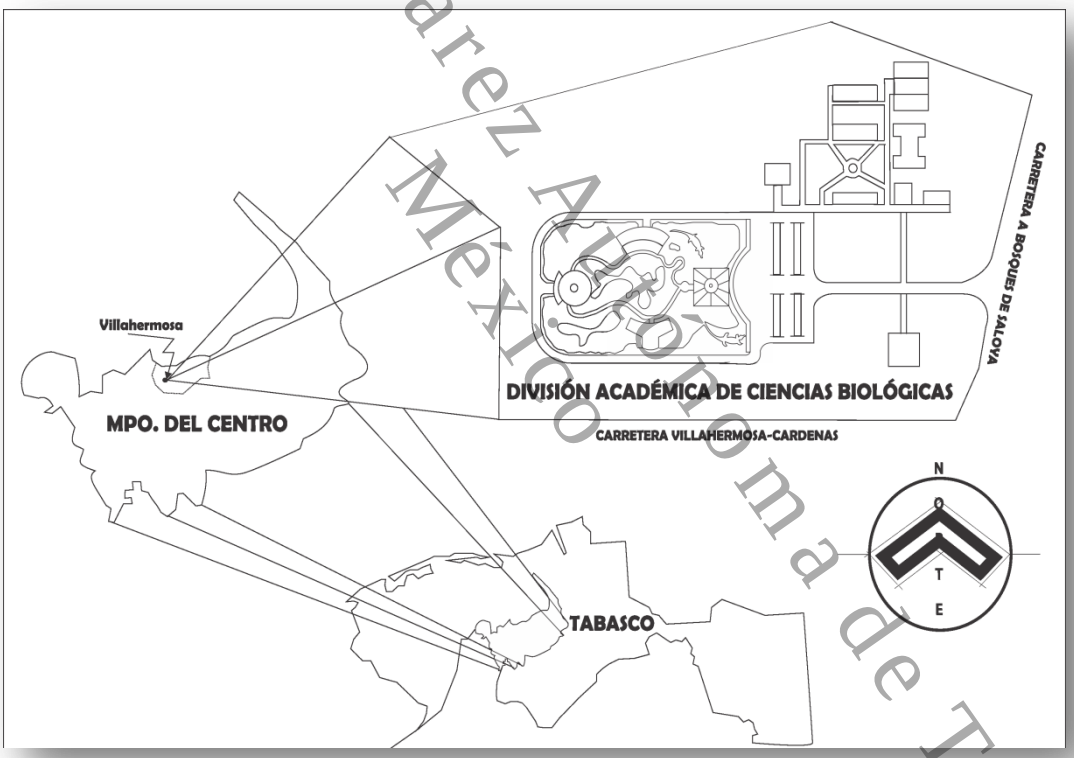


Figura 1. Área de estudio (Elaborado por: Marcelino Peralta Gamas)

La edad del manatí era de 2 a 3 semanas aproximadamente, cuando fue rescatado en la ranchería Barranca y Guanal sobre el Rio Grijalva, Municipio del Centro, Tabasco, el 26 de junio de 2011. A la fecha del inicio de este estudio el

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México

manatí presentaba una edad de 1 año y cuatro meses. El animal se encontraba en un estanque de plástico con dimensiones de 81cm de alto x 366cm de diámetro, con capacidad de 6,899 litros, que es suministrada por la red de agua potable. Posteriormente fue transferido a un estanque de concreto que tiene una medida de 5m de diámetro por 1.8m de profundidad (Figura 2).

Figura 2. Estanque de plástico donde se mantenía al manatí (*Trichechus manatus manatus* Linnaeus, 1758) al inicio de este estudio.

Toma y transporte de muestras

Se realizaron ocho muestreos seriados con un intervalo de 15 días entre cada uno, con el objetivo de no causar estrés en el animal. Cuatro muestreos se realizaron en el estanque de plástico. Posteriormente, cuatro meses después el animal se trasladó a un estaque de concreto y se realizaron otros cuatro muestreos. Ambos estanques eran suministrados con agua potable. Las muestras se tomaron rectalmente utilizando hisopos estériles realizando movimientos de rotación en las paredes rectales, hasta obtener suficiente muestra. Las muestras se almacenaron inmediatamente en Caldo Soya Tripticaseína con la finalidad de conservar viables las células bacterianas. Las muestras se transportaron al

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México

laboratorio de Microbiología de la División Académica de Ciencias Biológicas para su análisis inmediato.

Aislamiento y purificación

Las muestras obtenidas de las heces fecales se sembraron en medios selectivos por descargas directas y por triplicado en Agar Mac Conkey (McK), Agar *Salmonella* y *Shigella* (ASS), Agar Soya (AS) y Agar Eosina de Azul de Metileno (EAM).

Aislamiento de *Salmonella*

Para el aislamiento de *Salmonella* los hisopos se inocularon en Caldo de Soya Tripticaseína como medio de transporte, posteriormente en el laboratorio se transfirió cada hisopo, a tubos con caldo Selenio Selenito y Caldo tetrationato como medio de preenriquecimiento para el aislamiento e identificación de *Salmonella*, incubado a 35 °C durante 18-24 h (González *et al*., 2010).

Después de la incubación, se inoculó con un asa de platino a medios selectivos (Agar Salmonella y Shigella (SS) y Agar Sulfito de Bismuto (SB) para su aislamiento utilizando el método de estría cruzada e incubando al mismo tiempo y temperatura señalada en el párrafo anterior. Posterior al tiempo de incubación se seleccionaron las colonias típicas presuntivamente como *Salmonella* para su purificación. La Unidad Formadora de Colonia se caracterizan bajo los siguientes criterios: color, elevación, margen y forma según Winn *et al*., 2008 (Figura 3).

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México

Figura 3. Terminología estándar para la caracterización de la Unidad Formadora de colonia (Winn *et al*., 2008).

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México

Identificación de las cepas bacterianas

Pruebas tintoriales (Tinción de Gram)

Como primera fase de identificación taxonómica, se realizó la técnica de tinción de Gram (Figura 4), con el objeto de definir las características tintoriales y morfológicas de las diferentes cepas aisladas (Winn *et al.,* 2008; OMS, 2004).

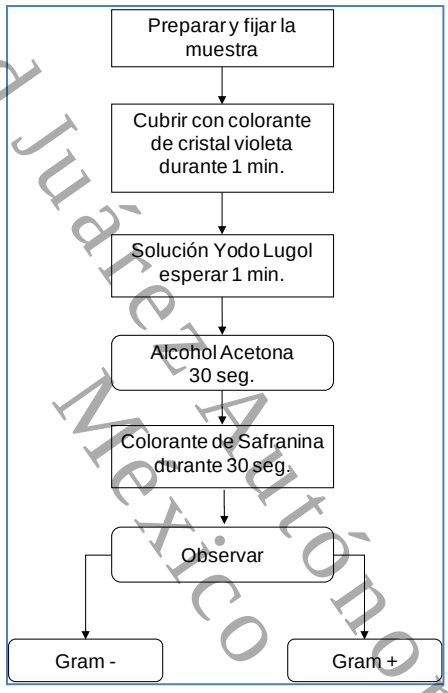


Figura 4. Esquema general de la técnica de tinción de Gram.

Identificación taxonómica

En la segunda fase de identificación taxonómica con las cepas obtenidas, se realizó el sistema miniaturizado API WEB, API 20 NE y API E (Biomérieux®).

Para las cepas bacterianas aisladas que presentaron una morfología de bastones Gram negativos, no fermentadores de lactosa; se utilizó el sistema API 20 NE, que permite la identificación de bacilos Gram negativos no enterobacterias. La Galería del sistema API 20 NE está compuesta por 20 microtubos (tubo o cúpula) que contienen sustratos deshidratados para ocho pruebas bioquímicas y 12 de asimilación además de la prueba de oxidasa (Tabla 1 y 2).

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México

Tabla 1. Pruebas bioquímicas utilizadas en la galería del sistema API 20 NE (Biomérieux®).

Pruebas bioquímicas	Componente que reacciona	Pruebas de asimilación	Componente que reacciona
NO_3	Reducción de NO_3; producción de N_2	**GLU**	Asimilación de glucosa
TRP	Degradación de triptófano hasta indol	**ARA**	Asimilación de arabinosa
GLU	Fermentación de glucosa	**MNE**	Asimilación de manosa
ADH	Producción de arginina dihidrolasa	**MAN**	Asimilación de manitol
URE	Hidrólisis de urea, producción de ureasa	**NAG**	Asimilación de N-acetil-glucosamina
ESC	Hidrólisis de esculina, producción de ß-glucosidas	**MAL**	Asimilación de maltosa
GEL	Geltatinasa	**GNT**	Asimilación de gluconato
PNPG	Beta-galactosidasa	**CAP**	Asimilación de caprato
		ADI	Asimilación de adipato
		MLT	Asimilación de malato
		CIT	Asimilación de citrato
		PAC	Asimilación de fenil-acetato

Tabla 2. Lectura de los diferentes pruebas bioquímicas para la identificación de bacilos Gram negativos no fermentadores de lactosa (API 20 NE).

Tests	Componentes activos	Reacciones/enzimas	Resultados	
			NEGATIVO	POSITIVO
NO3	Nitrato Potásico	Reducción de Nitratos en Nitritos	NIT 1 + NIT 2 / 2-5 min Incoloro	Rosa-Rojo
		Reducción de Nitratos en Nitrógeno	Zn/ 5 Min Rosa	Incoloro
TRP	L-triptofano	Formación de Indol (TRiPtofano)	JAMES/inmediato incoloro verde pálido/ Amarillo	Rosa
GLU	D-glucosa	Fermentación (GLUcosa)	Azul a verde	Amarillo

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México

ADH	L-arginina	Arginina DiHidrolasa	Amarillo	Naranja/Rosa/Rojo
URE	Urea	UREasa	Amarillo	Naranja/Rosa/Rojo
ESC	Esculina Citrato férrico	Hidrólisis (β-glucosidasa) (ESCulina)	Amarillo	Gris/Marrón/Negro
GEL	Gelatina (origen bovino)	Hidrólisis (Proteasa) (GELatina)	Sin difusión del pigmento	Difusión del pigmento negro
PNPG	4-nitrofenil-βD-galactopiranosida	B-galactosidasa (Para-Nitro-Fenil-βD-Galactopiranosidasa)	Incoloro	Amarillo
GLU	D-glucosa	Asimilación (GLUcosa)	Transparencia	Turbio
ARA	L-arabinosa	Asimilación (ARAbinosa)	Transparencia	Turbio
MNE	D-manosa	Asimilación (IMaNosA)	Transparencia	Turbio
MAN	D-manitol	Asimilación (MANitol)	Transparencia	Turbio
NAG	N-acetil-glucosamina	Asimilación (N-Acetil-Glucosamina)	Transparencia	Turbio
MAL	D-maltosa	Asimilación (MALtosa)	Transparencia	Turbio
GNT	Gluconatopotásico	Asimilación (GlucoNaTopotásico)	Transparencia	Turbio
CAP	Ácido cáprico	Asimilación (ácido CAPrico)	Transparencia	Turbio
ADI	Ácido adípico	Asimilación MaLaTa	Transparencia	Turbio
MLT	Acido Málico	Asimilación (ácido ADIpico)	Transparencia	Turbio
CIT	Citratotrisódico	Asimilación (CITratotrisódico)	Transparencia	Turbio
PAC	Ácido fenilacético	Asimilación (ácido fenilACético)	Transparencia	Turbio

Tabla 3. Lectura de las diferentes pruebas bioquímicas para la identificación de bacilos Gram negativos utilizando la galería del sistema API 20 E (Biomérieux®).

Pruebas Bioquímicas	Substratos	Reacciones/ enzimas	Negativo	Positivo
ONPG	Orto-nitro-fenil-galactósido	ß-galactosidasa	Incoloro	amarillo (1)
ADH	Arginina	Argininadeshidrolasa	Amarillo	rojo/naranja (2)
LDC	Lisina	Lisinadescarboxilasa	Amarillo	naranja

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México

ODC	Ornitina	Ornitinadescarboxilasa	Amarillo	rojo/naranja (2)
(CIT)	Citratosódico	Utilización de citrato	Verde-pálido/ amarillo	azul-verde/ azul (3)
H_2S	Tiosulfatosódico	Producción de ácidosulfhidrico	Incoloro/ gris	depósito negro
URE	Urea	Ureasa	Amarillo	rojo/naranja
TDA	Triptófano	Triptófanodesaminasa	Amarillo*	marrón*
IND	Triptófano	Producción de indol	Amarillo*	anillorojizo*
(VP)	piruvatosódico	Producción de acetoína "Voges-Proskauer"	Incoloro*	rojo-rosa
(GEL)	gelatina de Kohn	Gelatinasa	No difusión	difusión de pigmento negro
GLU	Glucosa	Fermentación/OxidacióndeGlucosa(4)	Azul/verdoso	Amarillo
MAN	Manitol	Fermentación/OxidaciónManitol (4)	Azul/verdoso	Amarillo
INO	Inositol	Fermentación/Oxidación Inositol (4)	Azul/verdoso	Amarillo
SOR	Sorbitol	Fermentación/Oxidación Sorbitol (4)	Azul/verdoso	Amarillo
RHA	Ramnosa	Fermentación/OxidacióndeRamnosa(4)	Azul/verdoso	Amarillo
SAC	Sacarosa	Fermentación/OxidacióndeSacarosa(4)	Azul/verdoso	Amarillo
MEL	Melibiosa	Fermentación/OxidacióndeMelibiosa(4)	Azul/verdoso	Amarillo
AMY	Amigdalina	Fermentación/OxidacióndeAmigdalina(4)	Azul/verdoso	Amarillo
ARA	Arabinosa	Fermentación/Oxidación de Arabinosa(4)	Azul/verdoso	Amarillo

*) Requiere la adición de reactivos
1. Un amarillo muy pálido debe considerarse positivo
2. Un color naranja pálido después de 24 horas de incubación podría considerarse negativo.
3. La lectura debe hacerse en la cúpula (aerobiosis)
4. La fermentación comienza en la parte inferior de los tubos, la oxidación en la superior

Para el caso de las cepas bacterianas con morfología de bastones, Gram negativos y fermentadores de lactosa, se utilizó el sistema API 20 E, el cual permite identificar aquellas bacterias que pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* y otros bacilos Gram Negativos. La galería API 20 E consta de 20 microtubos (tubo y cúpula) que contienen los sustratos deshidratados para 23 pruebas bioquímicas distintas (Tabla 3).

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México

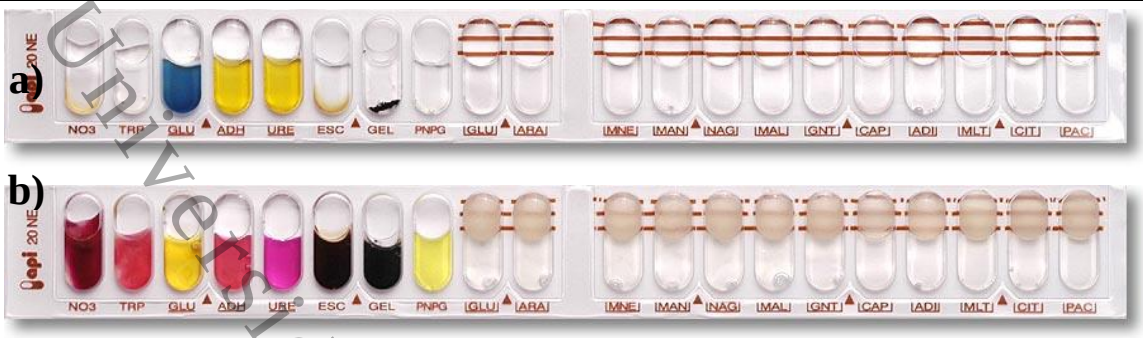


Figura 5. Galería API NE (Biomérieux). a) Pruebas negativas; b) Pruebas positivas.

Figura 6. Galería API E (Biomérieux). a) Pruebas negativas b) Pruebas positivas.

Preparación de las galerías API 20 E y API 20 NE (Biomérieux®)

Las galerías se colocaron en una cámara de plástico que contiene alveolos, a los cuáles se les agrega entre 5 a 8 ml de agua destilada, lo que proporciona una atmosfera húmeda en la cámara de incubación. Posteriormente se colocan las galerías, que se encuentran en bolsas térmicas estériles para su inoculación e incubación (Figura 5).

Preparación del inoculo para las pruebas API 20 E y API 20 NE (Biomérieux).

Cada cepa se resiembra en placas con Agar Mueller Hinton (Bioxon) con el objeto de obtener material biológico necesario para la inoculación de las galerías e incubadas durante 24 h a 35 ºC± 0.5 ºC. Después de la incubación, se realizó una suspensión bacteriana en 5 ml de solución salina (0,85%) hasta alcanzar una turbidez según el tubo 0,5 de la escala de McFarland (Figura 6).

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México

Inoculación de las galerías de las pruebas API 20 E y API 20 NE (Biomérieux®)

Los microtubos se llenaron con 150 µL de la suspensión bacteriana, con la ayuda de una micropipeta con puntas estériles evitando la formación de burbujas. Las galerías se incubaron a 35 °C ± 0.5 ºC y por efecto del metabolismo bacteriano se produjeron cambios de colores espontáneos o bien al añadir reactivos. La lectura de las reacciones se realizó según las Tablas 2 y 3 donde se indican las reacciones positivas o negativas (Figura 4 y 5). Los resultados fueron introducidos en el software de identificación API web™, el cual es un sistema que se encuentra en línea apiweb.biomerieux.com y que proporciona la identificación de la cepa a estudiar y el porcentaje de identificación. Para los ensayos de asimilación de la galería API 20 NE se utilizó una ampolleta API AUX Medium, transfiriendo 200 µL de la suspensión bacteriana y agitando varias veces con la misma punta, con esta suspensión se rellenaron las siguientes cúpulas; GLU, ARA, MNE, MAN, NAG, MAL, GNT, CAP, ADI, MLT, CIT y PAC.

Conservación de las cepas

La conservación consistió en mantener viables y cultivables a los microorganismos durante periodos de almacenamiento, accesibles de recuperarlos y conservar sus características genotípicas y fenotípicas íntegras. Para ello las cepas fueron almacenadas por duplicado en tubos eppendorf con capacidad de 1.5 ml, que contendrán caldo soya tripticaseína con glicerol al 50 %. Los tubos de BAB fueron incubados durante 24 h. Posterior al tiempo de incubación los tubos fueron tapados con papel parafilm y almacenados a 3-4 ºC, con resiembras periódicas cada 3 meses. Las cepas en caldo nutritivo se almacenaron bajo congelación a -18 ºC.

Análisis de Resultados

Con la finalidad de determinar si las especies identificadas son parte de la flora normal del manatí, los resultados obtenidos se compararon con otros estudios (Tabla 4), para establecer si estas especies bacterianas son causantes de enfermedades en el manatí.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México

Tabla 4. Especies bacterianas que se han reportado en algunos mamíferos marinos

Autor/Mamífero	*Especie*
Coles *et al*., (1978)- León marino, marsopa (cetáceo) y manatí	*Edwardsiella*
Marsh *et al*., (2011)- Manatí, dugón	*Aeromonas, Bacillus, Bacteroides, Citrobacter, Corynebacterium, Edwardsiella, Enterobacter, Escherichia, Eubacterium, Fusobacterium, Klebsiella, Lactobacillus, Pasteurulla, Plesiomonas, Proteus, Pseudomonas, Salmonella, Serratia, Staphylococcus* y *Vibrio.*
González *et al*., (2010)-Lobo marino común	*Edwardsiella tarda, Escherichia coli, Hafnia alvei, Morganella morganii, Proteus mirabilis, Klebsiella pneumoniae, Serratia rubidea, Providencia rustigianii* y *Citrobacter braakii.*
Ogawa *et al*., (2010)- Ballenas	*Enterococcus faecalis, Enterobacter cloacae, Escherichia coli, Clostridium* sp. Y *Edwardsiella ictaluri.*
Vigo *et al*.,(2011)- Focas	*Salmonella entérica*
Fernández *et al*., (2011)- Ballena picuda	Sp. *Photobacterium, Citrobacter freundii* y *C. koseri.*
Castinel *et al*. (2007)- León marino	*Hafnia alvei, Proteus mirabilis, Klebsiella pneumoniae, Providencia rustigianni* y *Citrobacter brakii.*
Buck *et al*., (2006)- Delfín nariz de botella.	*Achromobacter, Acinetobacter, Alcaligenes, Moraxella, Oligella, Pasteurella, Vibrio, Klebsiella pnuemoniae, Proteus vulgaris, Pseudomonas, Providencia alcalifaciens, Serratia liquifaciens, S. odorifera, Staphylococcus aureus* y *Citrobacter freundii.*
Winn *et al*., (2008)- Reptiles y anfibios	*Salmonella*
Kim *et al*., (2002)- Lobo marino	*Escherichia*
Gonzales y Fuentes *et al*., (2010)- Lobo marino y delfín mular	*Hafnia alvei, Klebsiella pneumoniae, Providencia rustigianni* y *Citrobacter brakii.*

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México

Sugita *et al*., (1996)- León marino	*Proteus mirabilis, Escherichia coli* y *Pseudomonas.*
Higgins *et al*., (2000)- Beluga, delfín nariz de botella y foca gris.	*Aeromonas hydrophila, Escherichia coli, Proteus mirabilis, Salmonella, Pseudomonas, Citrobacter.*
Kim *et al*., (2002)- Lobo marino	*Escherichia coli*

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México

6. Literatura Citada

1. Alcamo, EP. 2001. Laboratory Microbiology. Séptima Edition. Jones and Bartlett Publishers. EUA.310 p.
2. Algorta, G. 2004. Bacilos gram negativos no exigentes Enterobacteriaceae, Vibrionaceae, Pseudomonas. 14p
3. Buck, J; Wells, R; Rhinehart, H y Hansen, L. 2006. Aerobic microorganisms associated with Free-Ranging Bottlenose Dolphins in Coastal Gulf of Mexico and Atlantic Ocean Waters. Journal of Wildlife Diseases. 42(3): 536-544.
4. Castinel, AA; Grinberg, RP; Duignan, P; Pomroy, B; Rogers, L y Wilkinson, I. 2007. Characterization of *Klebsiella pneumonia* isolates from New Zealand sea lion *(Phocarctos hookeri)* pups during and after the epidemics on Enderby Island, Auckland Islands. Veterinary Microbiology 122: 178-184.
5. Colmenero-Rolón, L.C y E. Hoz-Zavala. 1986. Distribución de los manatíes, situación y su conservación en México, Anales del Instituto de Biología, UNAM, Ser. Zool, 56(3): 955-1020.
6. Coles, BM; Stroud; RK y Sheggeby, S. 1978. Isolation of *Edwardsiella tarda* from three Oregon sea mammals. Journal of Wildlife Diseases. 14: 339-341.
7. Cortés, MJ y Vázquez, VS. 2002. Inactivación y recrecimiento de enterobacterias en agua de consumo humano tratada con radiación solar. XXVII Congreso Internacional de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. Cancún México. 27 al 31 de Octubre.
8. Fernández, A; Vela, I; Andrada, M; Herraez, P; Díaz, J; Domínguez, L y Arbelo, M. 2011. *Citrobacter freundii* Septicemia in a Stranded Newborn Cuvier's Beaked Whale *Ziphius cavirostris*. Journal of Wildlife Diseases. 47(4): 1043-1046.
9. García, P. A y Rodríguez, F. M. 2010. Enterobacterias. Medicina. 10(51):3426-3431.
10. González-Fuentes, Mario; Latif, F; Fernández, F; Villanueva, MP; Ulloa, J y Fernández, H. 2010. Especies de la familia *Enterobacteriaceae* en heces de

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México

lobo marino común, *Otaria flavescens* establecido en el río Valdivia Revista de Biología Marina y Oceanografía. 45 (2): 331-334.

11. Granados, PR. y Villaverde, PC. 2002. Microbiología: Bacteriología. Características y clasificación bacteriana. Virología. Características y técnicas bioquímicas. Paraninfo. España. 323 p.
12. Güiris, A. D. M., Rojas, H. N. M., Berovides, A. V., Cruz, A. E., Chávez, H. C., Moguel, A. J. A., & Pérez, E. R. 2007. Análisis de la Microbiota Bacteriana, Aislada en Heces de Tapirus bairdii, de la Sierra Madre de Chiapas, México. Tapir Conservation, 15.
13. Hernández, OA. 2008. Estudio parasitológico del manatí antillano (*Trichechus manatus manatus)* en el estado de Tabasco, México. Tesis profesional. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Villahermosa, Tabasco, México.
14. Higgins, R. 2000. Bacteria and fungi of marine mammals: A review. Canadian Veterinary Journal 41: 105-116.
15. Kim, J. H; Lee, J. K; Yoo, H.S; Shin, N.R; Shin, N. S; Lee, K. H y Kim, D. Y. 2002. Endocarditis associated with *Escherichia coli* in a sea lion (*Zalophus californianus*). Journal of veterinary diagnostic investigation 14: 260-262.
16. Lefebvre LW, Marmontel M, Reid JP, Rathbun GB, Domning DP. 2001. Status and biogeography of the West Indian manatee. In: Woods CA, FE Sergile FE (eds.), Biogeography of the West Indies: Patterns and Perspectives. 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, 425–474.
17. Lluch, BD. 1965. Further notes on the biology of the manatee. Anal. Inst. Nal. Invest. Biol. Pesquera. 1: 405-419.
18. Madigan, TM; Martinko, JM y Parker J. 2004. Biología de los microorganismos. Prentice Hall. España. 3142p.
19. Marsh, H, M; O´Shea, T. J y Reinolds, J. E. 2011. Ecology and Conservation of the sirenia Dugongs and Manatees. Conservation Biology 18. Cambridge. 296-297pp.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México

20. Morales, VB. y Olivera, G. L. D. 1992. De sirenas a manatíes. Centro de Investigaciones de Quintana Roo. México. 32p.
21. Morales-Vela, B. 2000. Distribución, abundancia y uso de hábitat por el manatí en Quintana Roo y Belice, con observaciones sobre su biología en la Bahía de Chetumal, México. Tesis Doctoral, Universidad Nacional Autónoma de México. México, DF.
22. Olivera Gómez, LD y E. Mellink Bijtel. 2005. Distribución del manatí antillano (Trichechus manatus manatus) en función de las características del hábitat, en la Bahía de Chetumal, México. Conservación Biológica. 121: 127-133.
23. Ogawa, G; Ishida, M; Kato, H; Fujise, Y e Urano, N. 2010. Identification of facultative anaerobic bacteria isolated from the intestine of the minke whale *Balaenoptera acutorostrata* by 16S rRNA sequencing analysis. Fish. Sci. 76: 177-181.
24. Organización Mundial de la Salud. 2004. Manual de Laboratorio para la Identificación y Prueba de Susceptibilidad a los Antimicrobianos de Patógenos Bacterianos de Importancia para la Salud Pública en el Mundo en Desarrollo. Atlanta Georgia. 410 p.
25. Santoro, M; Orrego CM y Hernández G. 2006. Flora bacteriana cloacal y nasal de *Lepidochelis olivácea* en el pacifico Norte de costa Rica. Revista de Biología Tropical. 54 (1): 43-48.
26. SEMARNAT. 2001. Proyecto de conservación, recuperación y manejo del manatí *Trichechus manatus* en México. Serie 11. México. 54 p.
27. Sugita, H, Y Takanashi, Y Sasaki, T Nishina, E Aono, A Fujimoto & Y Deguchi. 1996. The intestinal microflora of sea lions reared in a aquarium. Fisheries Science 62: 321-322.
28. Vigo, G; Leotta, G; Caffer, M; Salve, A; Binsztein, N y Pichel, M. 2011. Isolation and Caracterization of *Salmonella enteric* from Antarctic Wildlife. Polar Biol. 36: 675-681.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México

29. Winn, C; Allens, D; Janda, M; Koneman, W; Procop, W; Schereckernberger, C y Woods, L. 2008. Koneman Diagnóstico Microbiológico texto y atlas en color 6ª edición. Editorial Panamericana. México. 1475 p.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México

Capítulo II. Articulo-Revista Peruana de Biología

Capítulo II

Título. Flora bacteriana de las heces fecales de una cría de manatí en rehabilitación.

*López-Hernández, Adolfo y Vázquez-Cruz, Lucero. Laboratorio de microbiología. División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, km 0.5. Carretera. Villahermosa – Cárdenas, Col. Bosques de Saloya, 86000, Villahermosa Tabasco, México.
*microbitoss@gmail.com; lucerovc@gmail.com

Resumen

En este estudio se identificaron 90 cepas bacterianas a partir de muestras rectales de una cría de manatí en cautiverio, en la División Académica de Ciencias Biológicas. Se realizaron ocho muestreos con intervalos de 15 días. Para la obtención de la muestra se utilizaron hisopos estériles, que posteriormente se inocularon en Agar *Salmonella* y *Shigella* y Agar Eosina de Azul de Metileno, a través del método por estría cruzada. Una vez aisladas y purificadas las muestras se identificaron con el método del sistema miniaturizado API 20 E Y API 20 NE. Se identificaron a tres familias, la más abundante fue *Enterobacteriaceae*, seguida de *Aeromonadaceae* y *Pseudomonadaceae*; determinando seis especies diferentes. Las especies más frecuentes, fueron *Escherichia coli*, *Aeromonas hydrophila* y *Proteus mirabilis*, que son consideradas como bacterias comensales del intestino de

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco México

diferentes mamíferos marinos: Dugones, delfines, ballenas. Se identificó en menor porcentaje a *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas luteola* y *Morganella morganii*, al igual que las enterobacterias se consideran parte de la microbiota intestinal de diversos mamíferos. El conocimiento de la flora bacteriana de una población en cautiverio es importante para el monitoreo del estado de salud y de las medidas de manejo, así como para prevenir riesgos potenciales de zoonosis.

Palabras claves: Manatí, Cautiverio, Enterobacterias, Bacterias, Heces Fecales.

Abstract

In this study 90 bacterial families were identified from the rectal samples of a captive manatee calf, at the Division of Biological Sciences UJAT. Eight samplings were made, with 15 days intervals. Samples were taken with and inoculated into Agar Salmonella and Shigella and Agar Eosine and Methylene Blue plates using the quadrant streaking technique. Once isolated and purified, samples were identified with the miniaturized system API strips 20 E and API strips 20 NE. Three families were identified; the most abundant was *Enterobacteriaceae*, followed by *Aeromonadaceae* and *Pseudomonadaceae*; distinguishing six different species. The

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México

most frequent species were *Escherichia coli*, *Aeromonas hydrophila* and *Proteus mirabilis*, considered as commensal bacteria living in the intestine of different marine mammals: dugongs, dolphins, whales. A low percentage of *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas luteola* and *Morganella morganii* was identified, they, are considered as part of the intestinal microbiota in several mammals. Knowing the bacterial flora of a colony in captivity is important for health monitoring and manipulation, as well as to prevent potential risks of zoonosis.

Key words: Manatee, Captivity, Enterobacteria, Bacteria, Faeces.

Introducción

Los manatíes son mamíferos adaptados para vivir completamente en el agua. Pertenecen al orden Sirenia, conformado por cinco especies recientes, de las cuales sólo sobreviven cuatro: *Trichechus manatus* (Linnaeus, 1758), *T. senegalensis* (Link, 1795), *T. inunguis* (Natterer, 1883) y el *Dugong dugong* (Müller, 1776) (Morales y Olivera, 1992).

Actualmente la información con enfoque sanitario o/y epidemiológico, hacia estas especias de mamíferos, aun son escasas o no están publicadas (Coles *et al*., 1978; Marsh *et*

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México

al., 2011), la mayoría de los investigadores se han centrado en aspectos ecológicos y parasitológicos (Hernández, 2008; Gómez *et al.*, 2010).

En mamíferos marinos se ha reportado a la familia *Enterobacteriaceae* como una de las principales colonizadoras del tubo digestivo. Esta familia se distribuye ampliamente en la naturaleza; tierra, agua, sobre plantas y como lo indica su nombre son parte del tubo digestivo de seres humanos y animales.

Algunas de las especies de esta familia se han reportan como patógenas para el hombre como; *E. coli, Klebsiella, Enterobacter, Salmonella*, por mencionar algunas de ellas, pueden llegar a producir desde una clásica diarrea hasta diarrea con sangre que puede llegar a causar la muerte si no se atiende oportunamente (Winn *et al.*, 2008).

Se ha documentado a *Escherichia coli, Pseudomonas, Proteus mirabilis, Aeromonas spp.*, como parte de la flora intestinal en manatí (Sugita *et al.*, 1996; Marsh *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2002). Se ha reporta a *E. coli* como causante de endocarditis bacteriana responsable de la muerte de un león marino en California en vida libre, la cepa fue aislada a

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México

partir de muestras de riñón, ganglios linfáticos, intestino y corazón. En Lobo marino, delfín nariz de botella, foca gris y delfín mular se han identificado a *Edwardsiella tarda, E. coli, Hafnia alvei, Proteus mirabilis, Klebsiella pneumoniae, Serratia rubidea, Providencia rustigianii y Citrobacter braakii*, que forman parte de la microbiota normal presentes tanto en organismos sanos como enfermos (Higgins *et al*., 2000; Castinel *et al*., 2007; González *et al*., 2010).

Entre las estrategias actuales para la protección del manatí se puede señalar los casos de animales en cautiverio con el objeto a su reintroducción (Semarnat/Conanp, 2010). En este sentido para mantener y rehabilitar estos animales es necesario monitorear su salud e instaurar las medidas sanitarias para un buen manejo.

Este estudio generara conocimiento de las especies presentes en condiciones de cautiverio y poder así comparar los resultados con manatí en vida libre, con el objetivo de determinar si son un reservorio de agentes zoonóticos (microorganismos), debido a que estos mamíferos están en contacto con aguas residuales de tipo doméstica, que no son solo un problema de salud pública sino también para los animales acuáticos (Haesebrouck et al., 2009). Las aguas

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México

residuales pueden llegar a alterar los factores ambientales (químicos, físicos y biológicos), causando estrés en los animales acuáticos.

Esta investigación se planteó el objetivo de caracterizar la flora bacteriana en muestras rectales de un manatí en cautiverio (DACBiol), con la finalidad de conocer su microbiota y aportar información para su rehabilitación. Además permitirá evaluar si los resultados obtenidos son los adecuados para una futura liberación del individuo y validar las medidas sanitarias efectuadas durante su cuidado

Materiales y métodos

Área de estudio

El manatí se encuentra confinado en la Unidad de Rehabilitación de Crías Huérfanas de Manatí de Tabasco, ubicada al Noroeste 19°89’062” y al Este 05°02’558”, en las instalaciones de la División Académica de Ciencias Biológicas - UJAT, en Villahermosa, Tabasco, México.

Toma de muestra

Se realizaron ocho muestreos seriados con un intervalo de 15 días entre cada uno, con el objetivo de no causar estrés en el animal. Los primeros cuatro muestreos, se realizaron

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México

cuando el animal tenía una edad aproximada un año y cuatro meses de edad, se mantenía en un estanque de plástico de 81 cm de alto x 366 cm de diámetro, con capacidad de 6,899 litros de agua. Posteriormente, cuatro meses después el animal se trasladó a un estanque de concreto de 5 m de diámetro por 1.8 m de profundidad y se realizaron otros cuatro muestreos. Ambos estanques eran suministrados con agua potable.

Las muestras se tomaron rectalmente utilizando hisopos estériles realizando movimientos de rotación en las paredes rectales. Las muestras se almacenaron inmediatamente en Caldo Soya Tripticaseína con la finalidad de conservar viables las células bacterianas y transportadas al laboratorio de microbiología, para su análisis inmediato.

Aislamiento e identificación bacteriana

Las muestras rectales se sembraron por descargas directas y por triplicado en Agar Mac Conkey (Mck), Agar Soya (AS) y Agar Eosina de Azul de Metileno (EAM).Las placas fueron incubadas a 35 °C durante 18-24 h. Como primera fase de identificación taxonómica, se realizó la técnica de tinción de Gram (Winn *et al.*, 2008), posteriormente se identificaron con el sistema miniaturizado API WEB (Biomérieux®),

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México

utilizando la galería bioquímica API 20 NE para bacilos Gram negativos no fermentadores y API E para bacilos Gram negativos fermentadores de lactosa.

Identificación de *Salmonella*

Las muestras rectales fueron inoculadas en tubos con caldo Selenio-Selenito y caldo tetrationato como medio de preenriquecimiento para el aislamiento de *Salmonella*, incubados a 35 °C durante 18-24 h (González *et al.*, 2010).

Posterior al tiempo de incubación las muestras fueron inoculadas en placas con Agar *Salmonella* y *Shigella* (SS) y Agar Sulfito de Bismuto (SB) incubando al mismo tiempo y temperatura señalada en el párrafo anterior. En Agar SS se seleccionaron aquellas colonias incoloras con producción ácido sulfhídrico (punto negro) y en Agar SB con coloración de marrones a negras con brillo metálico. Una vez seleccionadas y purificadas las cepas fueron identificadas con el sistema miniaturizado API WEB (Biomérieux®), utilizando la galería bioquímica API 20 NE para bacilos Gram negativos no fermentadores.

Resultados y Discusión

Se aislaron 90 cepas bacterianas agrupadas en tres familias, la más abundante fue *Enterobacteriaceae*, seguida de

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México

Aeromonadaceae y *Pseudomonadaceae*. De las cepas aisladas, se identificaron seis especies diferentes: *Proteus mirabilis, Escherichia coli, Aeromonas hydrophila, Pseudomonas aeruginosa, Morganella morganii y Pseudomonas luteola*.

En los primeros cuatro muestreos *P. mirabilis* fue la bacteria más frecuente, seguida de *E. coli*, *A. hydrophila* y *P. aeruginosa* (58, 31, 8 y 3%, respectivamente). Para los muestreos realizados en los últimos cuatro meses, *A. hydrophila* fue la especie más frecuente, seguida de *E. coli*, *P. luteola*, *P.* aeruginosa, *P. mirabilis* y *M. morganii* (44, 37, 7, 6, 4 y 2 % respectivamente).

En los resultados se observa que *P. mirabilis* se presentó en mayor proporción en los primeros cuatros muestreos, que corresponde al periodo en que el animal se encontraba en el estanque de plástico, posteriormente descendió a un 4 %, predominando la presencia de *A. hydrophila y E. coli* en el segundo muestreo.

Esta variación puede ser atribuida a la alimentación, debido a que en la primera etapa el manatí presentaba una dieta basada en formula láctea suministrada cuatro veces al día y complementada con una mezcla de pasto alemán, hoja de zarza y sombrilla. La dieta se modificó en el estanque de concreto con una toma de leche y el aumento en la cantidad de

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México

vegetación incluyendo las anteriores más lambedora, Egipto panameño y guatope.

Por otra parte, el cambio en la flora puede ser consecuencia que la leche favorece el crecimiento de otras bacterias como *Lactobacillus, Bifidobacterium y Streptococcus sp*, consideradas como estabilizadores de la flora microbiana, que elimina a patógenos enterotoxigénicos tales como *E. coli y Vibrio cholera* (Aranda, 1997; Rodriguez, 2009).

Las bacterias acidolácticas actúan como inhibidoras sobre otras bacterias tales como *E. coli, Neisseria gonorrhoeae, Pseudomonas sp, Staphylococcus aureus, Salmonella sp, Bacillus sp, Shigella sp y Vibrio sp*, debido a que llegan a producir sustancias antimicrobianas o producir metabolitos para neutralizar la enterotoxina de *E. coli* (Aranda, 1997).

Todas las especies identificadas se consideran bacterias comensales del intestino en diferentes especies de mamíferos como dugones, delfines, ballenas y humanos (Buck *et al.*, 2006, Ogawa *et al.*, 2010 y Marsh *et al.*, 2011). Algunas se comportan como saprofitas, es decir que se encuentran en el medio, son resistentes a los agentes externos, son muy poco exigentes en sus necesidades nutritivas, son capaces de

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México

crecer y desarrollarse en medios mínimos y llegar a producir infecciones (Cortés y Vázquez, 2002, Madigan *et al.*, 2004).

La familia *Enterobacteriaceae* se reporta como parte de la flora intestinal normal de los mamíferos, sus especies no necesariamente producen enfermedades e incluso algunas contribuyen en la función y la nutrición normal y ciertos géneros llegan a volverse patógenos, solo cuando colonizan los tejidos que están fuera del tubo intestinal (Güiris *et al.*, 2007).

E. coli es la especie bacteriana recuperada con mayor frecuencia en los laboratorios clínicos, es causante de enfermedades infecciosas que pueden afectar cualquier tejido y sistema orgánico humano, puede llegar a causar infecciones en las vías urinarias, heridas y neumonía. Algunas serotipos son altamente patógenos, causantes de colitis hemorrágica (Winn *et al.*, 2008).

Kim *et al.*, (2002), menciona que *E. coli* y *Pseudomonas* pueden llegar a causar endocarditis en perros y gatos. En su estudio reportan a *E. coli* como responsable de la muerte de un León marino (*Zalophus californianus)* en California. Las cepas de *E. coli* se aislaron en muestras de riñón, ganglios linfáticos, intestino y corazón, estos autores mencionan que

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México

fue la responsable de endocarditis bacteriana en el león marino y que pueden llegar a deteriorar el musculo cardiaco hasta causar la muerte (Winn *et al.*, 2008).

En los manatíes huérfanos se han reportado infecciones en el ombligo (onfalitis bacteriana) y peritonitis, que pueden llegar a causar la muerte de los manatíes, muchas de estas infecciones involucran a *P. aeruginosa, Salmonella spp., y Clostridium difficile* (Leslie *et al.*, 2001).

Sugita *et al.*, (1996) y Higgins, (2000), reportan a *E. coli* y *P. mirabilis en* lobo marino, provocando peritonitis y cuadros infecciosos extraintestinales.

Se identificó a *P. aeruginosa y luteola* aisladas en baja proporción (4 % cada una). Marsh *et al.*, (2011) y Higgins (2000), han reportado estas mismas especies en sirenios, beluga (*Delphinapterus leucas*), delfín nariz de botella (*Tursiops truncatus*) y foca gris (*Halichoerus grypus*), causantes de peritonitis y cuadros infecciosos extraintestinales.

En vida libre se ha reportado a *Salmonella panama* en Sirenios y en Florida a *Salmonella sp.* como causante de diarreas e incluso la muerte (Marsh *et al.*, 2011). Las Salmonelas se

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México

consideran bacterias patógenas primarias de otros animales como aves de corral, vacas, cerdos, mascotas, aves, ovejas, focas, burros, lagartos, víboras, ranas, sapos, tritones y salamandras, consideradas como la fuente principal de salmonelosis no tifoidea en los seres humanos. Los reptiles y los anfibios están colonizados comúnmente por *Salmonella* y eliminan el microorganismo a través de las heces fecales (Winn *et al.*, 2008).

En este estudio no se detectó la presencia del género *Salmonella*, por lo tanto las medidas de manejo han sido las adecuadas para evitar la presencia de esta bacteria patógena, cabe mencionar que durante este estudio no presento cuadros diarreicos.

Las seis especies identificadas en este estudio se consideran bacterias oportunistas, esto quiere decir que pueden llegar a causar cuadros clínicos desde ligeros hasta graves dependiendo del sistema inmunológico del manatí y de su cuidado (Algorta *et al.*, 2004).

Estudiar la flora bacteriana en un manatí en cautiverio es de vital importancia. Pues este conocimiento permite identificar aquellas especies presentes como parte de la flora normal del intestino de estos animales, además de identificar aquellos

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México

microorganismos causantes de enfermedades y en su caso poder contar con herramientas para aplicar tratamientos profilácticos y elevar el índice de supervivencia de los animales mantenidos ex situ.

Permitirá identificar individuos inmunodeprimidos o enfermos en vida libre, y prevenir zoonosis bacterianas, es decir aquellos microorganismos que se pueden trasmitir de animales a humanos o viceversa (Santoro *et al.*, 2006).

El conocimiento de la microbiología rectal de esta especie es fundamental para diagnosticar desordenes de la flora digestiva así como prevenir procesos secundarios o estrés, todo ello dirigido a optimizar programas de conservación, reproducción y rehabilitación.

Finalmente este estudio aporta información valiosa aplicable para la conservación, reproducción, repoblamiento y rehabilitación de la especie, evitando la proliferación de cepas patógenas causantes de cuadros diarreicos e infecciones en la piel.

Conclusión

Esta investigación es el primer reporte en Tabasco sobre microflora bacteriana en heces fecales de manatí en cautiverio, aportando información para los programas de

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México

conservación, reproducción y repoblamiento de las especies y además para la rehabilitación.

Con base en los resultados obtenidos se considera que las especies de bacterias aisladas y en las cantidades en que se encontraron no representan un peligro de salud en el manatí monitoreado.

No se aislaron cepas del género *Salmonella*, lo que significa que el manejo para el control sanitario ha sido el adecuado. Finalmente, se recomienda efectuar estudios en manatíes en vida libre para compararlo con lo encontrado en cautiverio.

Literatura Citada

1. Algorta, G. 2004. Bacilos Gram negativos no exigentes *Enterobacteriaceae, Vibrionaceae, Pseudomonas*. 14p.
2. Aranda, RJ. 1997. Bacterias acidolácticas como promotoras de la digestibilidad in vitro e in vivo. Tesis de Maestría Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Agronomía. Nuevo León.
3. Buck, J., Wells, R., Rhinehart, H., et al. 2006. Aerobic microorganisms associated with Free-Ranging Bottlenose Dolphins in Coastal Gulf of Mexico and Atlantic Ocean Waters. Journal of Wildlife Diseases. 42(3): 536-544.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México

4. Castinel, AA., Grinberg, RP., Duignan, P, et al. 2007. Characterization of *Klebsiella pneumoniae* isolates from New Zealand sea lion (Phocarctos hookeri) pups during and after the epidemics on Enderby Island, Auckland Islands. Veterinary Microbiology 122: 178-184.
5. Colmenero-Rolón, L.C y E. Hoz-Zavala. 1986. Distribución de los manatíes, situación y su conservación en México, Anales del Instituto de Biología, UNAM, Ser. Zool, 56(3): 955-1020.
6. Cortés, MJ y Vázquez, VS. 2002. Inactivación y recrecimiento de enterobacterias en agua de consumo humano tratada con radiación solar. XXVII Congreso Internacional de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. Cancún México. 27 al 31 de Octubre.
7. González-Fuentes, M., Latif, F., Fernández, F., et al. 2010. Especies de la familia *Enterobacteriaceae* en heces de lobo marino común, Otaria flavescens establecido en el río Valdivia Revista de Biología Marina y Oceanografía. 45 (2): 331-334.
8. Güiris, A. D. M., Rojas, H. N. M., Berovides, A. V., Cruz, A. E., et al. 2007. Análisis de la Microbiota Bacteriana, Aislada en Heces de Tapirus bairdii, de la Sierra Madre de Chiapas, México. Tapir Conservation, 15.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México

9. Haesebrouck, F., Pasmans, F., Flahou, B., et al. 2009. Gastric Helicobacters in Domestic Animals and Nonhuman Primates and Their Significance for Human Health. Clin. Microbiol. 22(2): 202-223.

10. Hernández, OA. 2008. Estudio parasitológico del manatí antillano (*Trichechus manatus manatus*) en el estado de Tabasco, México. Tesis profesional. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Villahermosa, Tabasco, México.

11. Higgins, R. 2000. Bacteria and fungi of marine mammals: areview. Canadian Veterinary Journal 41: 105-116.

12. Kim, J. H., Lee, J. K., Yoo, H.S., et al. 2002. Endocarditis associated with Escherichia coli in a sea lion (Zalophus californianus). Journal of veterinary diagnostic investigation 14: 260-262.

13. Leslie, AD y Frances, MD. Gulland 2001. Marine mammal medicine. 2nded. CRCPress. New York 952-954pp

14. Lluch, BD. 1965. Further notes on the biology of the manatee. Anal. Inst. Nal. Invest. Biol. Pesquera. 1: 405-419.

15. Madigan, TM; Martinko, JM y Parker J. 2004. Biología de los microorganismos. Prentice Hall. España.3142p.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México

16. Marsh, H, M; O´Shea, T. J y Reinolds, J. E. 2011. Ecology and Conservation of the sirenia Dugongs and Manatees. Conservation Biology 18. Cambridge. 296-297pp

17. Morales, VB. y Olivera, G. L. D. 1992. De sirenas a manatíes. Centro de Investigaciones de Quintana Roo. México. 32p.

18. Morales-Vela, B. 2000. Distribución, abundancia y uso de hábitat por el manatí en Quintana Roo y Belice, con observaciones sobre su biología en la Bahía de Chetumal, México. Tesis Doctoral, Universidad Nacional Autónoma de México. México, DF 143 pp.

19. Ogawa, G., Ishida, M., Kato, H, et al. 2010. Identification of facultative anaerobic bacteria isolated from the intestine of the minke whale Balaenoptera acutorostrata by 16S rRNA sequencing analysis. Fish. Sci. 76: 177-181.

20. Olivera Gómez, LD y E. Mellink Bijtel. 2005. Distribución del manatí antillano (*Trichechus manatus manatus*) en función de las características del hábitat, en la Bahía de Chetumal, México. Conservación Biológica. 121: 127-133.

21. Rodríguez, GM. 2009. Aislamiento y selección de cepas del género *Lactobacillus* con capacidad probiótica e

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México

inmunomoduladora. Tesis Doctoral Universidad de Barcelona. Barcelona, España.

22. Santoro, M., Orrego CM., y Hernández G. 2006. Flora bacteriana cloacal y nasal de Lepidochelis olivácea en el pacifico Norte de costa Rica. Revista de Biología Tropical. 54 (1): 43-48.

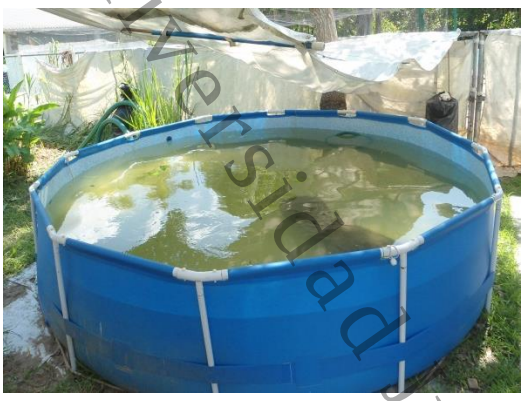
23. SEMARNAT. 2001. Proyecto de conservación, recuperación y manejo del manatí *Trichechus manatus* en México. Serie 11. México. 54p.

24. Sugita, H., Y Takanashi, Y Sasaki, et al. 1996. The intestinal microflora of sea lions reared in a aquarium. Fisheries Science 62: 321-322.

25. Winn, C., Allens, D., Janda, M., et al. 2008. Koneman Diagnóstico Microbiológico texto y atlas en color 6a edición. Editorial Panamericana. México. 1475 p.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México

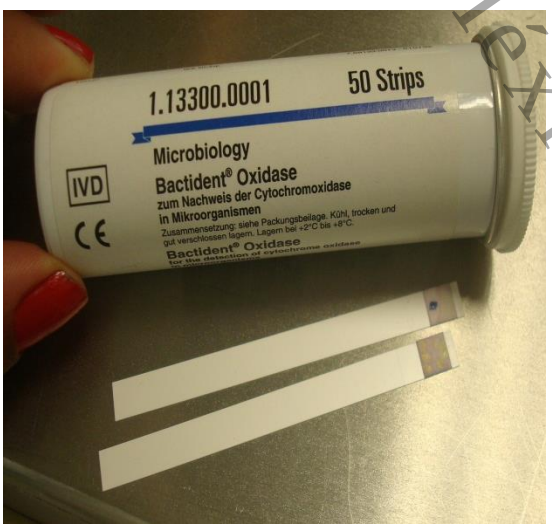
Anexo 1. Fotografías



a)

b)

a y b) Estanque de plástico donde se rehabilitaba a la manatí (*Trichechus manatus manatus* Linnaeus, 1758)., localizado en las instalaciones de la División Académica de Ciencias Biológicas.



a)

b)

a) Prueba de oxidasa.; b) Preparación de caldo Tetrationato (Medio selectivo para el aislamiento del género *Salmonella)*.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México

a)

b)

a y b) Preparación de las cepas bacterianas para su identificación en solución salina hasta alcanzar una turbidez de 0.5 según la escala de Mcfarland.

a)

b)

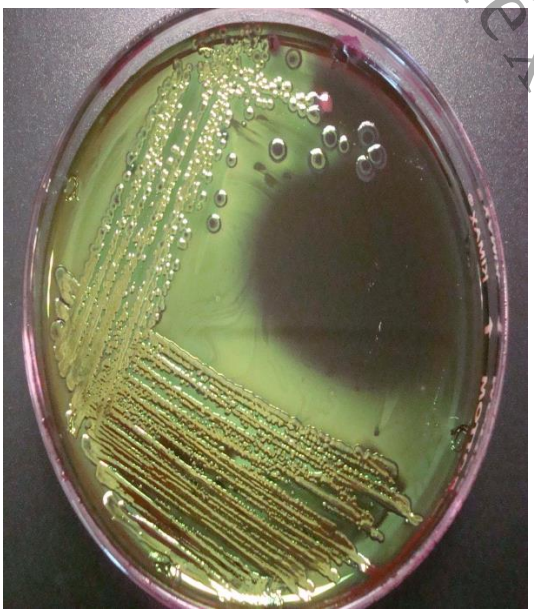
a) Preparación de las cepas bacterias en Agar Muller Hinton para su posterior identificación; b) Inoculación de las galerías API 20 E y API 20 NE.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México

a)

b)

a) Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias Gram negativas en API E; b) Lecturas de las reacciones de las pruebas bioquímicas API 20 NE y API E.

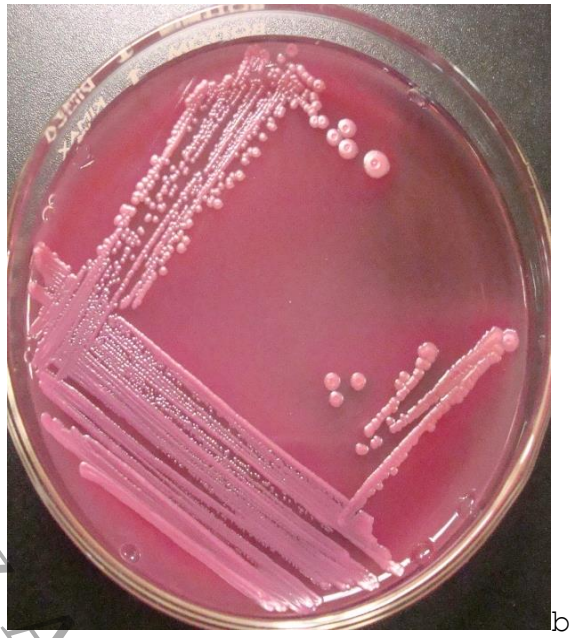

a)

b)

a) *Escherichia coli* en agar Eosina Azul de Metileno.; b) *Proteus mirabilis* en agar Mac Conkey.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México

a)


b)

a) Aeromonas hydrophila en agar Mac Conkey.; b) *Escherichia coli* en agar Mac Conkey.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México

a) *Pseudomonas aeruginosa* en agar Eosina Azul de Metileno.;
b) *Proteus mirabilis* en agar SS.

a) b)

a) Estanque de concreto donde se traspasó al manatí. b)Toma de muestra rectal con un hisopo estéril.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México

Anexo 2. Normas editoriales

INSTRUCCIONES A LOS AUTORES

Alcance y política editorial

REVISTA PERUANA DE BIOLOGÍA

La Revista Peruana de Biología está dedicada a la publicación de los resultados de investigaciones originales e inéditas en las áreas de Biodiversidad, Biotecnología, Manejo ambiental, Ecología y Biomédicas. Los trabajos recibidos son evaluados por miembros del Comité Consultivo y árbitros externos según criterios de creatividad, originalidad y contribución al conocimiento.

Forma y preparación de manuscritos

El articulo deberá ser enviado acompañado de una carta al Editor Jefe, indicando el carácter inédito, original y responsable del trabajo.

El artículo debe ser entregado por triplicado, el texto del artículo debe ser presentado en letras Courier 12 puntos, doble espacio en papel bond A4. El título no debe de exceder de 12 palabras, debe expresar el contenido real del trabajo; si incluye un nombre genérico o específico se indicarán los taxa de referencia.

El artículo deberá ser acompañado de los respectivos archivos electrónicos del texto, leyenda y tablas en MS-Word, gráficos de MS-Excel y otras ilustraciones en formato TIFF.

Las figuras incluyen mapas, esquemas, fotografías, diagramas, dibujos, gráficos, etc. Deben estar separadas del texto y su ubicación debe señalarse con lápiz en el margen derecho del manuscrito. Los dibujos, diagramas, mapas y gráficos deben ser presentados en papel Canson y en tinta china, en un tamaño A4, montados sobre cartulina blanca. Los dibujos y fotos de estructuras y organismos deben llevar una escala para facilitar la determinación del aumento.

Solamente se reciben los positivos de fotografías en blanco y negro, con amplio espectro de tonos y buen contraste,

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México

montados en cartulina blanca A4. Costos por fotografías a color deben de ser asumidos por el autor.

Las leyendas de las figuras deben presentarse en hoja aparte y deben ser suficientemente explicativas. Las figuras y tablas se enumerarán en orden correlativo con números arábigos. Cada tabla debe llevar un título descriptivo en la parte superior; las fotografías se considerarán figuras para su numeración.

Solo se acepta fotos digitales con resoluciones mayores de 600 dpi y más de 15 x 10 cm de tamaño, en formato TIFF.

Los nombres científicos del género y especie irán en cursivas. La primera vez que se cita un organismo deberá hacerse con su nombre científico completo (género, especie y autor); posteriormente podrá citarse solamente la inicial del nombre genérico y el nombre especifico completo.

Debe usarse unidades del Sistema Internacional de Medidas. Si fuera necesario agregar medidas en otros sistemas, las abreviaturas correspondientes deben ser definidas en el texto. Decimales con coma, no punto (ejemplo: 0,5).

La Revista cuenta con las siguientes secciones:

a. Trabajos originales. Son artículos inéditos de investigaciones en las áreas de las Ciencias Biológicas. Deben contener las siguientes partes: Título (en castellano y en inglés), nombre de los autores, Institución de los autores, Dirección del autor a la que deben dirigirse las correspondencias, Resumen no mayor de 250 palabras (en castellano e inglés), 5 palabras clave (en castellano e inglés), Introducción, Material y Métodos, Resultados, Discusión, Agradecimientos y Literatura Citada. Todo el artículo debe tener en promedio 20 páginas, las tablas y figuras deben ser solo las necesarias para una mejor exposición de los resultados.

b. Notas científicas. Son reportes de resultados de interés para la comunidad científica cuya extensión no será mayor de 4 páginas. Esta sección debe tener las siguientes partes: Título (en castellano e inglés), nombre del autor, institución de los autores, dirección del autor a la que debe dirigirse la correspondencia, Resumen no mayor de 250

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México

palabras (en castellano e inglés), cuerpo del artículo y Literatura Citada.

c. Artículos de Revisión. En esta sección se incluyen trabajos que constituyen una exhaustiva revisión de un tema de las Ciencias Biológicas. Deben contar las siguientes partes: Título (en castellano e inglés) nombre del autor, nombre de la Institución, dirección del autor, Resumen (en castellano e inglés), cuerpo del artículo y Literatura Citada.

d. Comentarios. Son artículos de opinión respecto a temas de interés en las Ciencias Biológicas. Deben contar con las siguientes partes: Título (en castellano e inglés), nombre del autor, nombre de la institución, dirección del autor, cuerpo del artículo y Literatura Citada.

Las citas en el texto deben incluir nombre del autor y año (ejemplo: (Carrillo, 1988) o de acuerdo a Sánchez (1976) o (Chávez y Castro, 1998; Rios, 1999; Piedra, 2001)). Si hay varios trabajos de un autor en un mismo año, se citará con una letra en secuencia adosada al año (ejemplo: Castro, 1952a). Cuando hay más de dos autores se citará al primer autor y se colocará et al. (Ejemplo: (Smith et al., 1981) o "según Smith et al. (1981)").

La Literatura Citada incluirá todas las referencias citadas en el texto dispuestas en orden alfabético del apellido del primer autor, sin número que la anteceda. Ejemplos:

Hernaez, P. and S. Palma. 2003. Fecundity, egg volume and reproductive output of five species of intertidal porcellanids from northern Chile (Decapoda, Porcellanidae). Investig. mar. 31 (2): 35-46

Echeverria, C. A. 2002. Black corals (Cnidaria: Anthozoa: Antipatharia): first records and a new species from the Brazilian coast. Rev. biol. trop. 50 (3-4):1067-1077

Uzcanga, G., J. M. Galan-Caridad, K. N. Suarez, et al. 2003. Divalent cation hinder the solubilization of a tubulin kinase activity from Trypanosoma cruzi epimastigotes. Biol. Res. 36 (3-4): 367-379.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México

Catala, S. S., D. M. Maida, H. Caro-Riano, et al. 2004. Changes associated with laboratory rearing in antennal sensilla patterns of Triatoma infestans, Rhodnius prolixus, and Rhodnius pallescens (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 99 (1): 25-30.

Las citas de artículos en prensa deben incluir el volumen, el año y el nombre de la revista donde saldrán publicados; de lo contrario deberán ser omitidos.

Solamente deberán citarse referencias validas, esto es publicadas en revistas u otras de carácter periódico. Debe evitarse las citas a resúmenes de congresos, eventos y comunicaciones personales.

El autor principal recibirá libres de costo 10 separatas de su artículo. Un número de separatas adicional podrá ser solicitado antes de la impresión teniendo en cuenta los costos respectivos.

Envío de manuscritos

Leonardo Romero
Revista Peruana de Biología
Facultad de Ciencias Biológicas UNMSM
Casilla Postal: 11-0058 Lima-11

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México