



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

**MORTALIDAD EN HUEVOS NO ECLOSIONADOS DE LAS TORTUGAS  
MARINAS *Caretta caretta* Y *Chelonia mydas* DEL CENTRO TORTUGARIO  
XPU HA DE QUINTANA ROO**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

**PRESENTA:**

**ROSALINDA LUCIO VELASCO**

**ASESOR:**

**DR. GUILLERMO VALDIVIA ANDA**

**COASESORA:**

**DRA. MARÍA ALEJANDRA AYANEGUI ALCÉRRECA**

**Cuautilán Izcalli, Estado de México**

**2010.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**PROYECTO PAPIME PE 200707**

**CATEDRA DE INVESTIGACIÓN PACIVE CONS 210**

**ALUMNA BECARIA EN EL PROGRAMA INTEGRAL DE  
CONSERVACIÓN DE TORTUGAS MARINAS FUNDACION PALACE  
RESORTS, A. C. DE C.V.**

**Y**

**FOMENTO ECOLÓGICO BANAMEX**

**PERÍODO: DE JULIO A DICIEMBRE DE 2009**

**ESTE TRABAJO FUE REALIZADO CON EL EQUIPO E  
INSTALACIONES DE**

**LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MULTIDISCIPLINARIA EN  
SALUD ANIMAL (UIMSA) DE LA FES-CUAUTITLÁN CAMPO 4**

**Y**

**EL LABORATORIO DE DIAGNOSTICO INTEGRAL VETERINARIO  
(DIVET®)**

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por permitirme recorrer este camino y llenar mi vida de bendiciones.

A mi asesor el Dr. Guillermo Valdivia Anda, por todo el apoyo y empeño para que este sueño se realizará.

A mi coasesora la Dra. María Alejandra Ayaneguí Alcérreca, por su apoyo incondicional, por transmitirme sus conocimientos y ser una persona excepcional en todos los aspectos, mil gracias.

A la Bióloga Gisela Maldonado Saldaña por su valiosa contribución en este proyecto, por su tiempo, paciencia y por confiar en mí.

Al MVZ Ricardo Javier Morales Flores por su asesoría y ser parte de mi formación como profesionista, nunca olvidaré tus palabras...Gracias.

Al MVZ Jorge Alfonso Herrera Farías por las enseñanzas y vivencias en el Campamento.

Al M en C César Cuenca Verde por asesorarme en todo momento y por su amistad.

A la fundación Palace y Fomento ecológico Banamex por el financiamiento y a la UMA Xpu Ha por las instalaciones y material facilitado.

A todos mis compañeros del laboratorio 3 de UIMSA, en especial a Heriberto Chávez y José Antonio Roldan Sánchez.

A la QFB Doris Yadira Arcila y el QFB Marco del laboratorio “Martínez y Arcila” por la asesoría.

Al jurado que realizó las correcciones en este trabajo; M en C Gerardo López Islas, MVZ Rodolfo Córdova Ponce, MVZ María del Consuelo Álvarez Rodríguez y M en C Tiziano Santos Morin.

A todos mis profesores que durante la carrera ayudaron a mi formación y sobre todo a la UNAM, FES- Cuautitlán, con orgullo “Por mi raza hablara el espíritu”.

## **DEDICATORIAS**

A mis padres Roberto Lucio Luna “Viejo” e Isabel Velasco López “Pingü”, gracias por el apoyo que siempre me han brindado, sus consejos, su cariño interminable, todo el esfuerzo que pasaron para que pudiera terminar mi carrera. Y por el principal regalo que me ofrecieron “la vida”. Por ustedes soy lo que soy, los amo.

A mis hermanas Susi y Cheli ustedes han sido mi fuerza para seguir adelante, gracias por sus consejos, su apoyo y por todo el amor que compartimos.

A Lalo mi amor, me has dado todo sin pedir nada a cambio y me has enseñado lo valioso y hermoso de la vida. Gracias por estar siempre a mi lado.

A mi cuñado Miguel Ángel muchas gracias por todo tu apoyo y cariño.

A mi Mamá Teresa por tu cariño y que siempre estas al pendiente de nosotras, te quiero mucho abuelita.

A la familia Acosta López, que siempre ha estado en los momentos tanto felices como difíciles.

## ÍNDICE

1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	2
3. Antecedentes y Justificación.....	3-4
4. Hipótesis.....	5
5. Objetivos.....	5
6. Materiales y Métodos.....	6-15
7. Resultados.....	16-33
8. Discusión.....	34-42
9. Conclusiones.....	43
10. Apéndices.....	44-47
11. Bibliografía.....	48-51

## 1. RESUMEN

El objetivo del proyecto fue identificar bacterias aerobias y la resistencia a antibióticos en huevos no eclosionados de las tortugas marinas Caguama (*Caretta caretta*) y Blanca (*Chelonia mydas*) asociado tanto a factores naturales como antropogénicos, en el campamento tortuguero Xpu Ha de Quintana Roo, México. El presente estudio se realizó bajo el permiso de colecta científica Of. No. SGPA/DGVS/04297/09. Se lograron coleccionar 23 embriones de huevos no eclosionados posterior al período de incubación natural, de los cuáles 12 pertenecieron a la especie *Caretta caretta* y 11 a la especie *Chelonia mydas* en diferentes etapas de desarrollo. Se tomaron muestras de albúmina, hígado y líquido gástrico para ser procesadas mediante pruebas bacteriológicas de rutina. Las muestras se transportaron al laboratorio 3 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria en Salud Animal (UIMSA) de la FES Cuautitlán-UNAM. Los embriones fueron conservados en recipientes con paraformaldehído bufferado al 4% para posteriores análisis. Los resultados obtenidos fueron; para *Caretta caretta* 8 huevos demostraron un tipo de crecimiento bacteriano y para *Chelonia mydas* fueron 7, de éstos (n=15) se logró identificar 11 géneros bacterianos distintos. Para *Caretta caretta* a la tinción de Gram resultó una proporción de 66.33% Gram negativos y 33.66% Gram positivos con un total de 30 aislamientos y para *Chelonia mydas* 86.66% Gram negativos y 13.33% Gram positivos con un total de 15 aislamientos. Se realizó el antibiograma con 17 antibióticos diferentes para cada una de las cepas aisladas; para la ampicilina (AMP), cloxacilina benzatínica (CB) y penicilina benzatínica (PB) la resistencia fue del 100%, seguido de la cloxacilina sódica (CX), lincomicina (LM) que fue del 97.78%. Para la amikacina (AMK) y la enrofloxacina (ENR) no se observó resistencia bacteriana.

## 2. INTRODUCCIÓN

En la actualidad se reconoce que el éxito de la conservación de las tortugas marinas depende de la participación activa de las comunidades en conjunto con las autoridades, los científicos y las organizaciones no gubernamentales. El objetivo principal de los programas de protección debe ser producir crías sanas, que tengan mayor posibilidad de sobrevivir, crecer y aumentar las poblaciones (Sarti L. *et al.*, 2006).

Las primeras tortugas marinas evolucionaron hace aproximadamente 110 millones de años. Es un grupo de animales sumamente exitoso, que sobrevivió a la extinción de los dinosaurios y se ha distribuido en todos los océanos del planeta. Los científicos las consideran especies bioindicadoras, pues el tamaño y la salud de las poblaciones de tortugas marinas proporcionan una indicación de la salud general del mar y la costa (Perrault A. *et al.*, 2003).

Las tortugas marinas pertenecen al orden testudinata, siendo común reconocer tres subórdenes: Amphichelydia, Cryptodira y Pleurodira. El suborden Cryptodira para las tortugas marinas con cuello retráctil en el plano vertical. La mayoría de las tortugas marinas pertenecen a la familia *Cheloniidae* (Márquez, 1996). Tienen un caparazón constituido por grandes huesos y cubierto de placas córneas, al igual que otros quelonios. Esta familia comprende siete especies: la tortuga caguama (*Caretta caretta*), la tortuga blanca (*Chelonia mydas*), la negra (*Chelonia agassizii*), la tortuga carey (*Eretmochelys imbricata*), la tortuga lora (*Lepidochelys kempii*), la tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*) y la tortuga aplanada (*Natator depressus*), esta última no se encuentra en el territorio mexicano. Y la familia *Dermochelidae* que comprende una única especie, la tortuga laúd (*Dermochelys coriácea*). (Arnold N y Ovenden D, 2002; Márquez R, 1996). En el estado de Quintana Roo es posible localizar cuatro de estas siete especies: la tortuga caguama (*Caretta caretta*), la tortuga blanca (*Chelonia mydas*), la tortuga carey (*Eretmochelys imbricata*) y la tortuga Laúd (*Dermochelys coriacea*). Sin embargo, para este estudio se hace referencia a la tortuga caguama *Caretta caretta* y la tortuga blanca *Chelonia mydas* que son las especies que llegan a anidar en la bahía de Xpu Ha.

### 3. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

El **Centro para la Protección y Conservación de la Tortuga (CPCTMXP) Xpu Ha**, Quintana Roo, (Of. No. **SGPA/DGVS/03766/09**), lleva a cabo actividades de protección y conservación de tortugas marinas desde hace 10 años, financiada con fondos de la Fundación Palace, A.C. y recursos otorgados a esta fundación por parte del programa de Fomento Ecológico Banamex.

El CPCTMXP, ha unido esfuerzos de colaboración con **la Unidad de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre (UMA) Xpu Ha** (INE/CITES/DGVS-ZOO-P-0048-97-QR) que es un desarrollo turístico encargado de preservar el medio ambiente y fauna silvestre y lleva laborando 10 años, en apoyo al programa de tortugas marinas mediante personal capacitado, espacios físicos de resguardo, investigación y laboratorio.

Actualmente las poblaciones de tortugas marinas han declinado drásticamente a lo largo de la Región del Caribe y Xpu Ha no es la excepción. La elevada mortalidad inducida por el impacto antropogénico ha puesto en riesgo las cuatro especies de tortugas que existen en esta costa. El incremento de las actividades humanas debido al turismo (palapas, camastros, campistas, luces, etc.) el aumento de la población y la navegación marítima impactan negativamente los hábitats esenciales de las tortugas marinas. La contaminación por residuos sólidos, degradación, erosión, derrame de hidrocarburos y productos tóxicos, así como fenómenos hidrometeorológicos, amenazan seriamente a estas especies y sus hábitats en nuestras costas y en todo el Gran Caribe (Ruíz, A. *et al.*, 2007).

El manejo de las nidadas y huevos es importante, ya que a pesar de que las hembras adultas producen miles de huevos en toda su vida, los índices de mortalidad de los embriones son elevados debido a factores naturales y antropogénicos. Es conocido que sólo una fracción de huevos producirá crías y muy pocas de estas crías sobrevivirán las décadas necesarias para alcanzar la madurez sexual (Ruíz, A. *et al.*, 2007). Es por esto que a las tortugas marinas se les considera como especies en peligro de extinción y se les coloca en el Apéndice I de acuerdos del CITES (Convención sobre el Comercio Internacional de

Especies Amenazadas de Flora y Fauna Silvestres por sus siglas en inglés), (Eckert L. *et al.*, 2000).

Poco se conoce sobre el impacto de las enfermedades infecciosas bacterianas en las poblaciones de tortuga marina en estado natural y sobre el papel que varios microorganismos puedan desempeñar como agentes patógenos tanto en la anidación como a lo largo de su vida (Glazebrook y Campbell, 1990).

La resistencia bacteriana hacia los antibióticos de muestras provenientes de la “naturaleza” tiende a ser cada vez más preocupante a nivel global (Rice *et al.*, 1995). La resistencia depende de la presencia y propagación de antibióticos en el ambiente. (Al- Bahry *et al.*, 2003). En consecuencia, la resistencia a antibióticos provenientes de lugares cercanos como; hospitales, enfermerías, clínicas, consultorios y gente altamente susceptible a infecciones contribuyen con la propagación de bacterias resistentes. Los antimicrobianos usados para el tratamiento de humanos, animales (terrestres y acuáticos), así como en los alimentos, son finalmente residuos arrojados al ecosistema terrestre y marino, en ambos casos da como resultado la resistencia bacteriana hacia los antibióticos (Silbergeld *et al.*, 2008).

En el 2002 Santoro M. y colaboradores en Costa Rica estudiaron la flora bacteriana nasal y cloacal de tortugas golfina hembras (*Lepidochelys olivácea*), los resultados obtenidos fueron de un total de 99 aislamientos bacterianos, incluyendo 10 grupos de Gram-negativos y 5 de Gram-positivos; 35 bacterias fueron encontradas en cloaca y 64 en cavidades nasales. Las bacterias más frecuentes halladas fueron *Aeromonas spp* y *Citrobacter freundii*, en cloaca. *Bacillus spp* fue el más frecuente en cavidades nasales, seguido de *Staphylococcus aureus* y *Corynebacterium spp*.

En el 2003 Al-Bahry S. y colaboradores en Arabia Saudita estudiaron la flora bacteriana y la resistencia a antibióticos en 90 huevos de tortuga blanca (*Chelonia mydas*), de aislamientos provenientes del cascarón, yema y albúmina, donde el 42% de estos resultaron contaminados por 10 géneros bacterianos, de las cuáles *Pseudomonas spp* fue el más frecuente y fueron sometidos a 14 antibióticos para evaluar la resistencia, donde la ampicilina presentó la mayor resistencia. Poco después, en el 2003 Santoro M. y

colaboradores estudiaron la flora bacteriana aerobia nasal y cloacal en tortugas verdes (*Chelonia mydas*) en Costa Rica donde el microorganismo más registrado fue *Klebsiella pneumoniae*.

El objetivo principal del presente estudio estuvo encaminado a realizar la investigación, identificando aquellos microorganismos patógenos, así como la resistencia a antibióticos, en huevos de tortuga marina, correlacionando algunas variables ecológicas e impacto de la actividad humana, asociados al manejo de las nidadas en los programas de conservación.

colaboradores estudiaron la flora bacteriana aerobia nasal y cloacal en tortugas verdes (*Chelonia mydas*) en Costa Rica donde el microorganismo más registrado fue *Klebsiella pneumoniae*.

El objetivo principal del presente estudio estuvo encaminado a realizar la investigación, identificando aquellos microorganismos patógenos, así como la resistencia a antibióticos, en huevos de tortuga marina, correlacionando algunas variables ecológicas e impacto de la actividad humana, asociados al manejo de las nidadas en los programas de conservación.

#### **4. HIPÓTESIS**

- ☛ Una de las principales causas de mortalidad en huevos de tortugas marinas puede deberse a la infección por bacterias aerobias condicionado por la movilización de las nidadas y a la contaminación ambiental asociados a la actividad del ser humano así como al cambio climático.

#### **5. OBJETIVO GENERAL**

- ☛ Identificar las posibles causas de mortalidad debida a bacterias, al término del período de la incubación natural en huevos no eclosionados.

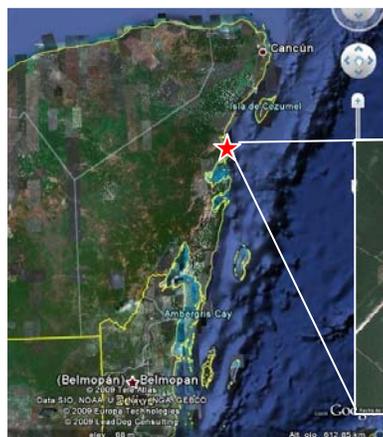
##### **5.1 OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Determinar la frecuencia de mortalidad en las nidadas de tortugas *Caretta caretta* y *Chelonia mydas* en el campamento tortuguero Xpu Ha.
2. Establecer por medio de la morfometría de los huevos en qué etapa de la incubación se detuvo el crecimiento de los embriones.
3. Aislar e identificar por medio de pruebas bacteriológicas de rutina las bacterias aerobias como posibles causantes de la mortalidad en huevos de tortugas marinas.
4. Determinar la resistencia a antibióticos de las bacterias aisladas.
5. Correlacionar las observaciones y resultados de laboratorio con algunas variables ecológicas (Estación del año, posición geográfica, e impacto antropogénico) así como especie y edad de los embriones.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

El proyecto de investigación corresponde a un diseño observacional y transversal.

El muestreo se realizó en el campamento tortuguero Xpu Ha de Quintana Roo, México, abarcando un área de 1.86 km (figura 1), dividida en 5 estaciones de acuerdo a lo preestablecido por el CPCTMXP; Xp1 al norte a Xp5 al sur (figura 2). Se colectaron datos de tantas nidadas como fue posible (n=15) durante el período comprendido entre los meses de Agosto a Noviembre de la temporada 2009.



Zona de protección. 1.86 Km

Dividido en 5 estaciones de aproximadamente 460 m



COORDENADAS EXTREMAS UTM.

16473893 E. 2264312 N. PUNTA NORTE.

16472818 E. 2262948 N. PUNTA SUR.

Fig. 1 Ubicación del campamento tortuguero Xpu Ha  
Referencia: <http://panpramio.com/photo/11575>



Figura 2. Estaciones del campamento tortuguero Xpu Ha

## **6.1 DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO**

El área de protección se localiza en el litoral central del Estado de Quintana Roo, dentro del Municipio de Solidaridad, en la playa conocida con el nombre de Xpu Ha (figura 1) entre las coordenadas UTM 16473893 E, 2264312 N, 16472818 E y 2262948 N. Comprende una bahía flanqueada por dos puntas rocosas al norte y al sur. La parte arenosa se extiende por 1.860 km e incluye varios desarrollos hoteleros, bares y clubes de playa (Maldonado G, 2008).

Xpu Ha se encuentra dividido en 5 estaciones; Xp1 al norte hasta Xp5 al sur (figura 2), cada estación mide alrededor de 300 metros de longitud, a su vez, esta se divide en zonas A, B y C. La zona A o intermareal la cual ocupa de la línea de marea hasta la primer berma. La zona B o zona supramareal es la zona semiseca de playa. Y la zona C donde se encuentran las dunas costeras.

### **6.1.1Clima**

El clima según la clasificación de Köpen modificado por García (1973), es *Am f*, cálido subhúmedo con lluvias en verano. La temperatura media anual es de 26° C, las temperaturas más bajas se registran en el mes de enero con 14° C y las máximas se alcanzan en el mes de agosto con 33° C. Los vientos predominantes son del sureste. La precipitación pluvial anual oscila entre los 1,300 y los 1,500 milímetros con estación de lluvia de marzo a noviembre. El clima se ve afectado por los Ciclones o Huracanes, que aumentan la precipitación sobre todo en el verano. La temporada de Huracanes se extiende de junio a noviembre (Gobierno del estado, 2009).

### **6.1.2. Fauna**

Los animales de la región son principalmente de origen neotropical, sin embargo están presentes animales de origen neártico como el venado cola blanca. Los principales grupos son representados por los anfibios, reptiles, aves y mamíferos. Los cuales representan un recurso importante de la localidad. (Gobierno del estado, 2009; Maldonado G, 2008)

### **6.1.3. Flora**

La vegetación de duna costera que se encuentra a lo largo de la bahía de Xpu Ha, es muy variable y está relacionada con la anchura de la duna, la comunidad se compone de plantas halófitas, dominadas por pequeñas palmas y grandes suculentas. (Maldonado G, 2008).

## **6.2 TRABAJO DE CAMPO**

Las labores dentro del campamento tortuguero Xpu Ha, consistieron en realizar patrullajes nocturnos por toda la playa, iniciando de punta sur a punta norte y viceversa.

Inmediatamente que la tortuga era vista se examinó en la etapa de anidación que se encontraba y una vez que ovopositó, se procedió a llenar un formato (Anexo 1) con toda la descripción de la misma.

### **6.2.1. Técnica de Manejo de nidos**

Solo se realizó el manejo de nidos cuando el riesgo de perderlos era inminente tanto por factores antropogénicos como naturales, para lo cual se procedió a realizar su reubicación dentro de la misma playa o el trasplante al corral de protección. La reubicación en playa consistió en trasladar el nuevo nido dentro de las cinco estaciones de Xpu Ha (figura.2), se buscó la zona más segura y cercana al sitio de puesta. Para el trasplante a corral los nidos se transportaron a un vivero o zona cercada dentro de la playa, para estas dos técnicas los huevos se sembraron en nidos de forma y tamaño similar al natural, tomando en cuenta las diferencias para las dos especies de acuerdo a Sarti L, *et al.*, 2006, utilizando guantes de látex desechables. En cuanto a la incubación *in situ* o natural los huevos no eran movidos, por lo tanto se incubaron en el sitio donde la tortuga ovopositó. La figura 3 muestra los sitios de anidación preferidos para cada especie.

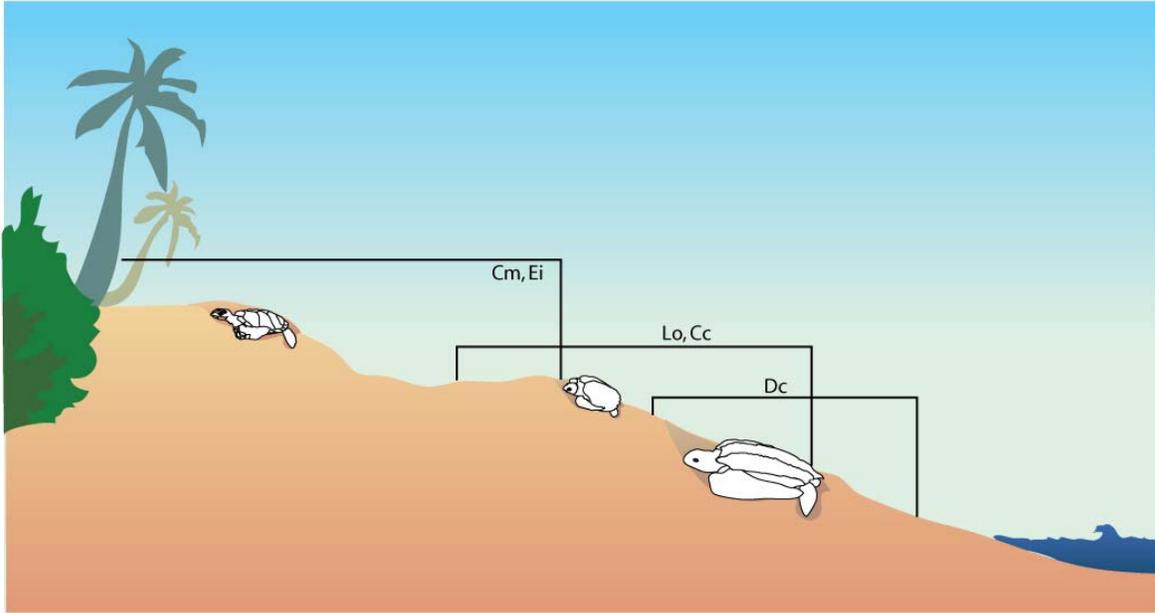


Figura. 3: Sitios de anidación seleccionados por las diferentes especies de tortugas marinas (Cm: *C. mydas*, Ei: *E. imbricata*; Lo: *L. olivacea*, Cc: *C. caretta*; Dc: *D. coriacea*). Chacon et al, 2007.

### 6.2.3. Detección de término del período de incubación

A fin de detectar la salida o eclosión temprana de las crías, cada nido fue monitoreado a partir de los 45 días posteriores al inicio de la incubación. El momento de emergencia, eclosión u otra observación fue anotado en un registro (Anexo 2).

### 6.2.4. Limpieza de Nido

Posterior a la eclosión de las crías, el nido fue limpiado de forma manual utilizando guantes de látex, se cuantificó el porcentaje de huevos no eclosionados (HNE), crías muertas, crías vivas o eclosionando, así como los restos de cascarones en el caso de que las crías hayan emergido por sí solas, esta información fue llevada en un registro (Anexo 2).

Los huevos no eclosionados se trasladaron a la UMA Xpu Ha para su posterior análisis morfológico y bacteriológico.

## **6.3 TRABAJO EN LABORATORIO.**

### **6.3.1. Instalaciones**

En la UMA Xpu Ha se llevo a cabo el proceso inicial de las muestras. La mesa de trabajo se desinfectó con clorhexidina diluida al 2% (Nolvasan solución®). Así mismo el procedimiento se realizó con guantes de látex, cubre bocas, mecheros de alcohol y material de disección previamente esterilizado por calor seco para evitar cualquier contaminación externa.

### **6.3.2. Ovoscopia**

La observación se realizó para los huevos no eclosionados (HNE) con un ovoscopio. Este instrumento fue fabricado con un tubo de PVC, una bombilla con un foco de 40w, conectado directamente a la corriente y que proyecta un haz de luz blanca sobre el huevo, provocando su translucidez, facilitando de esta forma la visión interior del huevo, se observó si el huevo era fértil o no. Se determinó la proporción de huevos no eclosionados clasificando las observaciones como: huevos con desarrollo aparente (HCDA), huevos sin desarrollo aparente (HSDA) y huevos en estado de putrefacción por lo que no fue posible su identificación (HNI). Las diferentes fases de desarrollo embrionario fueron interpretadas de acuerdo a Miller J., 1985 (Cuadro 1).

Cuando la mortalidad fue alta (>40%) se tomo el 10% de ésta y cuando la mortalidad fue baja, (< 30%), se trató de coleccionar hasta 10 huevos por nidada de esta mortalidad, tomando en cuenta que los huevos debían estar enteros, sin ningún tipo de abertura.

Posterior a la ovoscopia, los HNE que aparentemente no presentaban embrión (HSDA y HNI) (Ver cuadro 1), se abrieron para llevar un registro de fertilidad, la información fue registrada en los formatos del anexo 2 y los datos referentes a los huevos muestreados en este trabajo, se muestran en los anexos 3 y 4.

### 6.3.3. DISPOSICIÓN DE DESECHOS

Los huevos que no se utilizaron para muestra fueron colocados en una composta fría en las instalaciones de la UMA Xpu Ha para fomentar su degradación y descomposición. Los cadáveres fueron inhumados. El producto final fue usado para fertilizar y enriquecer la tierra.

Cuadro 1. Clasificación de Huevos no eclosionados de las tortugas marinas *Caretta caretta* y *Chelonia mydas* en el Campamento Tortuguero Xpu Ha.  
Tomado y modificado de Miller J. D, 1985

Huevos no eclosionados	
Sin Desarrollo Aparente (HSDA)	Huevos donde se observa separada la albúmina de la yema, sin evidencia de blastocisto, pueden ser de consistencia cremosa, color beige, rosa o con áreas púrpuras.
No identificados (HNI)	No se distingue ningún tipo de desarrollo, son de apariencia oscura, dentro del huevo y en el cascarón se consideran como huevos podridos.
Con Desarrollo Aparente (HCDA)	Fase 1: embrión muy pequeño, sin pigmentación, o remanentes de sangre.
	Fase 2: embriones, a mitad del desarrollo, presentan pigmentación, yema en un 50%
	Fase 3: Se observa el embrión bien formado, casi a término, la presencia de yema es <25%

### 6.3.4. Toma de Muestra

Para la toma de muestra el huevo se desinfectó sumergiéndolo en clorhexidina diluida al 2% (Nolvasan solución®). Una vez desinfectado, para los embriones que su crecimiento se interrumpió en fase 1, 2 y 3 (ver cuadro 1) se escindió una porción de 5 mm de diámetro en el cascaron del huevo y se extrajo un mililitro albúmina con una jeringa estéril. En el caso de disponer de embriones en crecimiento ya fuera en las fases 2 y 3 se extrajo el embrión completo y se colocó en una caja de petri estéril, se realizó un corte en línea media del plastrón donde se localizó el hígado, de este se tomó una porción con unas pinzas de disección y fue colocado en un tubo tipo eppendorf estéril con capacidad de 1ml. Inmediatamente se localizó el estómago y se sustrajo tanto volumen de líquido gástrico como fuera posible obtener con una jeringa estéril.

### **6.3.5. Conservación de embrión**

Una vez recuperado el embrión completo se sumergió en recipientes con paraformaldehído bufferado al 4% para su fijación y fueron enviados a la FES Cuautitlán- UNAM en el laboratorio 3 de la UIMSA para posteriores análisis.

### **6.3.6. Cultivo bacteriológico**

La albúmina, el líquido gástrico así como el hígado fueron sembrados por la técnica americana en el medio de cultivo de Agar sangre, medio enriquecido para el crecimiento de algunas bacterias patógenas, usado para el aislamiento primario. (Quinn *et al.*, 2002). El medio fue elaborado en el Laboratorio Microbiológico “Martínez y Arcila”, ubicado en Avenida Juárez s/n entre 45 Norte y Carretera Federal Col. Centro Playa del Carmen, Q. Roo. Se preparó añadiendo 5% de sangre de carnero en el Agar Soya Trypticaseína (Bioxon). Posteriormente se vertió en cajas de petri estériles desechables, las cuáles se sometieron a prueba de esterilidad por 24 horas a 37°C y se conservaron en refrigeración durante todo el tiempo, antes y después de ser utilizado.

### **6.3.7. Crecimiento de cepas**

Posterior al sembrado de las muestras en el medio de cultivo, las cajas de petri se colocaron dentro de una incubadora bacteriológica a una temperatura de 37°C por 24 horas. Una vez transcurrido el tiempo se revisó el medio para observar si se obtuvo algún crecimiento bacteriano, se registró todo en una base de datos con su respectiva identificación como; estación en la que se localizó el nido (Xp1 a Xp5), número de nido (romano), número de huevos para muestra (letra minúscula), así como tipo de muestra albúmina (1), hígado (2), líquido gástrico (3). Las diferentes cepas se resembraron por agitación del asa, en el medio de cultivo Stuart (Difco), previamente colocado en tubos tipo eppendorf de 1ml, y fueron enviadas a la FES Cuautitlán UNAM para su posterior análisis bacteriológico en el laboratorio 3 de la UIMSA.

Una vez localizadas las cepas en el laboratorio 3 de UIMSA, se realizó el primer aislamiento en medios de cultivo selectivos; Agar Mac Conkey (Bioxon), Eosina Azul de Metileno (EMB) (Bioxon), Sal y Manitol (Merck) y Agar sangre (Bioxon) y se dejaron

incubar a 37°C por 24 horas. Ya obtenidos los aislamientos de los diversos medios de cultivo se procedió a la siembra en el Agar Soya Trypticaseína (Dibico) para el segundo aislamiento y así mismo para continuar con la identificación del género y la especie bacteriana. Las diferentes cepas se sembraron en medio especial en frascos de vidrio estériles con tapón de hule hermético.

### **6.3.8. Identificación primaria de las bacterias**

La tinción de Gram se realizó de acuerdo a la técnica de Quinn *et al.*, 1994 interpretándose como; gram positiva o gram negativa así como la morfología celular (cocos o bacilos).

## **6.4 PRUEBAS PRIMARIAS**

### **6.4.1 Prueba de catalasa**

Para desarrollar la prueba, se colocó en un portaobjetos una gota de agua oxigenada, esta resultó positiva cuando se efectuó en ella una emulsión densa de la bacteria y la formación de burbujas, tomada de una colonia con un asa (Prats G, 2005).

### **6.4.2. Prueba de la oxidasa**

La producción de oxidasa se evaluó colocando unas gotas de la solución N-dimetil-p-fenilendiamina, en una tira de papel filtro, situada sobre una caja de petri. Con ayuda de un palillo de madera, se depositó sobre el papel el microorganismo tomado del cultivo. (Prats G, 2005)

## **6.5 PRUEBAS SECUNDARIAS**

Se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas: Citrato de Simmons (Merk), Urea (Bioxon), Sorbitol, se utilizó base caldo rojo de fenol (Bioxon), adicionado con 3% de D-Sorbitol (Sigma), Malonato (Difco), Rojo de Metilo y Voges Proskauer (MR-VP) (Bioxon).

Pruebas múltiples: Triple Hierro Azúcar (TSI) (Bioxon), Lisina Hierro Agar (LIA) (Bioxon) y Motilidad Indol Ornitina (MIO) (Bioxon).

Las cuales se incubaron a 37° C por 24 horas y 48 horas en el caso de la prueba MIO, se determinó el género y de algunas se logro determinar la especie bacteriana, mediante las tablas de clasificación bacteriana de Cowan S, 1979 y Osbaldiston G, 1973.

## **6.6. ANTIBIOGRAMA**

Cada aislamiento fue sembrado en caldo soya tripticaseína (Bioxon) y se dejo incubar a 37° C por 24 horas. Posteriormente cada cepa fue sembrada con un hisopo estéril en 2 cajas de petri, en medio para antibiótico No 11. (Bioxon), se colocaron 8 sensidiscos comerciales de antibióticos en una caja y en la otra 9, teniendo en total 17 sensidiscos para cada cepa, los cuales fueron; Ampicilina (AMP), Amikacina (AK), Cefalotina Sódica (CF), Ceftriaxona Sódica (CRO), Cloramfenicol (CL), Cloxacilina Benzatínica (CB), Cloxacilina Sódica (CX), Dihidroestreptomicina (DS), Enrofloxacin (ENR), Espiramicina de Adipato (EA), Estreptomicina (SM), Gentamicina (GE), Lincomicina (LM), Neomicina (NEO), Penicilina Benzatínica (PB), Tetraciclina (TT) y Trimetroprim/Sulfametoxasol (STX). Se dejaron incubar por 24 horas a 37° C y posteriormente se midieron los halos de inhibición de cada antibiótico, fueron interpretados de la siguiente manera; donde no se observó halo de inhibición se consideró que la cepa fue resistente al antibiótico; para un halo de inhibición de  $\leq 19$ mm se interpretó como intermedio y para un halo  $\geq 20$ mm se consideró susceptible.

## **6.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Durante todo el proceso de muestreo cada nido fue identificado en orden progresivo así como cada huevo, su tipo de crecimiento bacteriano, así como la resistencia a cada antibiótico. Se desarrolló un sistema de captura de datos empleando el Software EXCELL (Microsoft Office).

Para el análisis de resultados se utilizó estadística descriptiva, gráficos de frecuencias y porcentajes con intervalo de confianza al 95% de las diversas variables de interés en el estudio. Para la estadística analítica, se utilizó Ji cuadrada ( $\chi^2$ ); Razón de probabilidades (OR); Riesgo Relativo (RR) y Regresión logística simple como herramientas de análisis para las variables dependientes mortalidad en huevos no eclosionados y/o tipo de aislado con las variables independientes: ecológicas (Número de nidada, número total de huevos y

de no eclosionados, especies y tipo de asilado bacteriano), todos con un valor-p (<0.05) para aceptar diferencias estadísticamente significativas. Los análisis estadísticos se realizaron con el apoyo de Programas EXCELL (Microsoft Office) y NCSS 2000 - PASS 2001 (Jerry Hintze 2001).

Se estimó la fertilidad, sobrevivencia y mortalidad mediante las siguientes fórmulas

$$\text{SOBREVIVENCIA (\%)} = \frac{\text{CV}}{\text{HP}} \times 100$$

$$\text{FERTILIDAD (\%)} = \frac{\text{CV} + \text{HCDA}}{\text{HP}} \times 100$$

$$\text{MORTALIDAD (\%)} = \frac{\text{CM} + \text{HCDA}}{\text{HP}} \times 100$$

Nota: CV= Crías vivas liberadas al mar; HP= Huevos totales protegidos de la nidada, incluyendo a todas las categorías; HCDA= huevos con desarrollo aparente; CM= crías muertas.

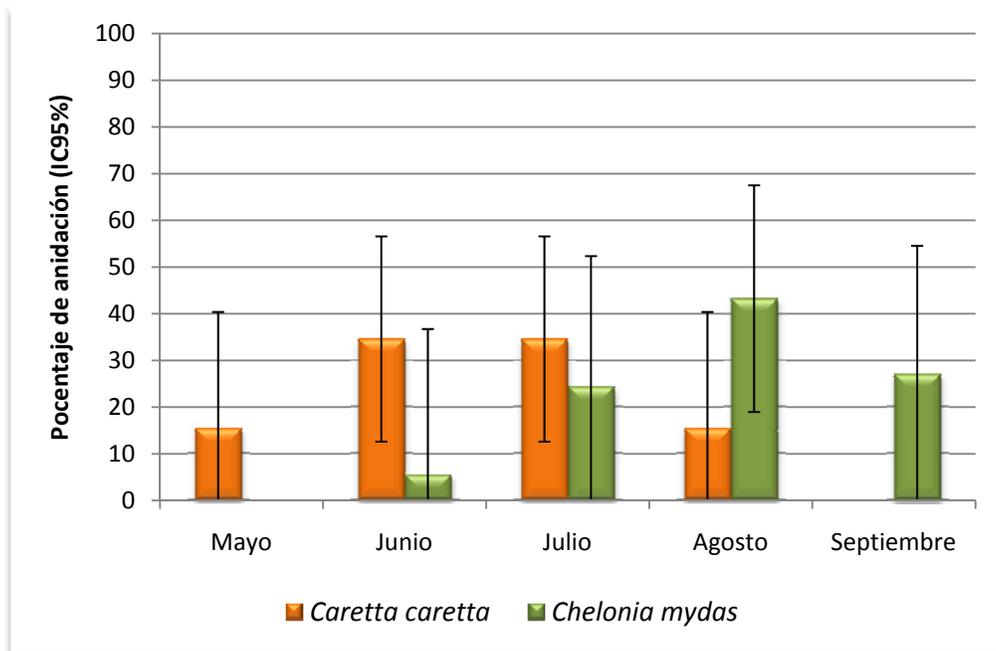
## 7. RESULTADOS

La temporada dio inicio el 9 de mayo de 2009 con el primer nido reportado de caguama (*Caretta caretta*) y finalizó el 23 de octubre de 2009 con las últimas crías liberadas para esta especie. Para la tortuga blanca (*Chelonia mydas*) inicio el 18 de junio de 2009 y finalizó el 18 de noviembre del mismo año.

El Número **total de nidos** fueron **89**, de los cuales 52 pertenecieron a *Caretta caretta* con 5,241 huevos, donde la media por nido fue 100.7 huevos ( $\pm 3.5$ ) y un total de 4,076 crías vivas liberadas (77.7%); (IC95% 76.6-78.9%). Para *Chelonia mydas* correspondieron 37 nidos, con 4,024 huevos, la media por nido fue de 108.7 huevos ( $\pm 3.2$ ) y un total de 3,679 crías vivas liberadas (91.4%); (IC95% 90.5-92.3%).

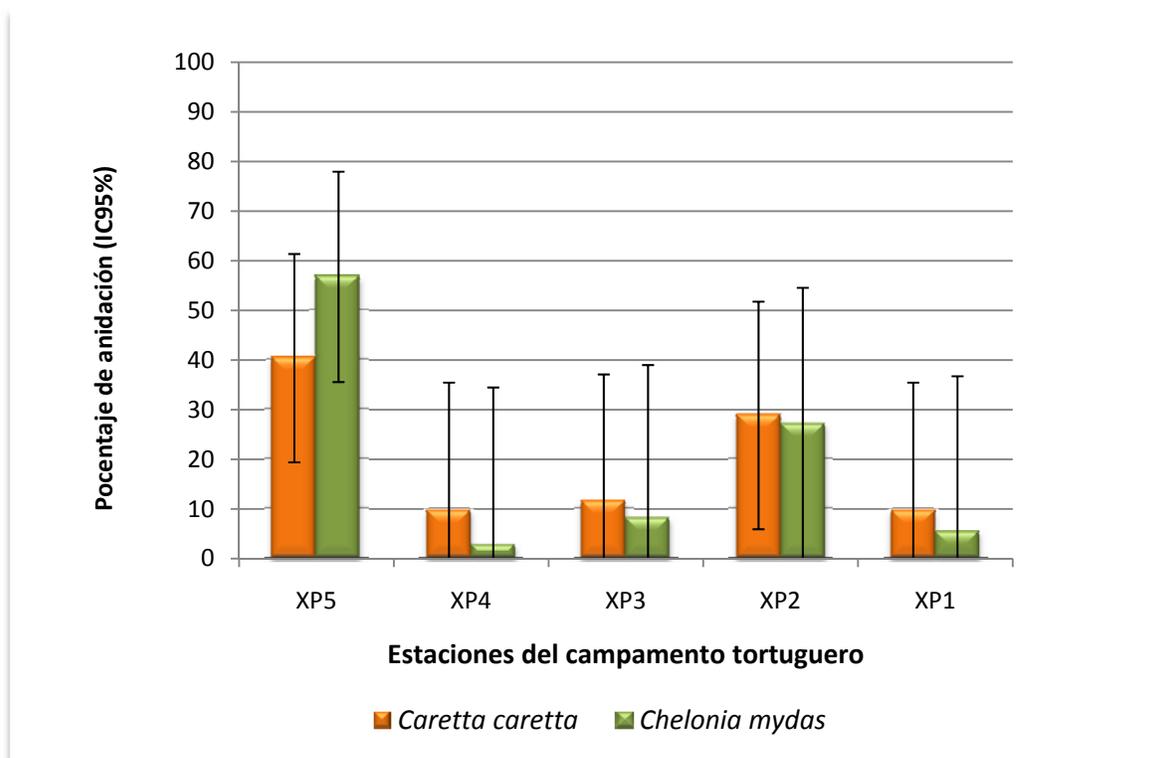
Se observó que el pico de anidación para *Caretta caretta* se presentó en los meses de junio y julio con 36 nidos, lo que equivale al 63% del total para la especie. En tanto para *Chelonia mydas* el máximo de anidación fue en los meses de agosto y septiembre con 26 nidos, o sea el 70.2% del total para esta misma (Figura 4).

Figura 4. Anidación mensual de las especies *Caretta caretta* y *Chelonia mydas*, Campamento Tortuguero Xpu Ha.



En lo que respecta a la distribución geográfica las dos especies anidaron principalmente en la estación XP5 con un total de 42 nidos, lo que corresponde al 47.1% del total de anidación de la temporada. Las estaciones de menor preferencia fueron XP4 y XP1 con 6 y 7 nidos respectivamente, lo que corresponde al 14.6%. Sin embargo el análisis estadístico por  $\chi^2$  indica que no hay diferencia entre la preferencia de anidación ( $p= 0.47$ ) (Figura 5).

Figura 5. Porcentaje de distribución geográfica de anidaciones para las especies *Caretta caretta* y *Chelonia mydas*, en el Campamento Tortuguero Xpu Ha. Temporada 2009.

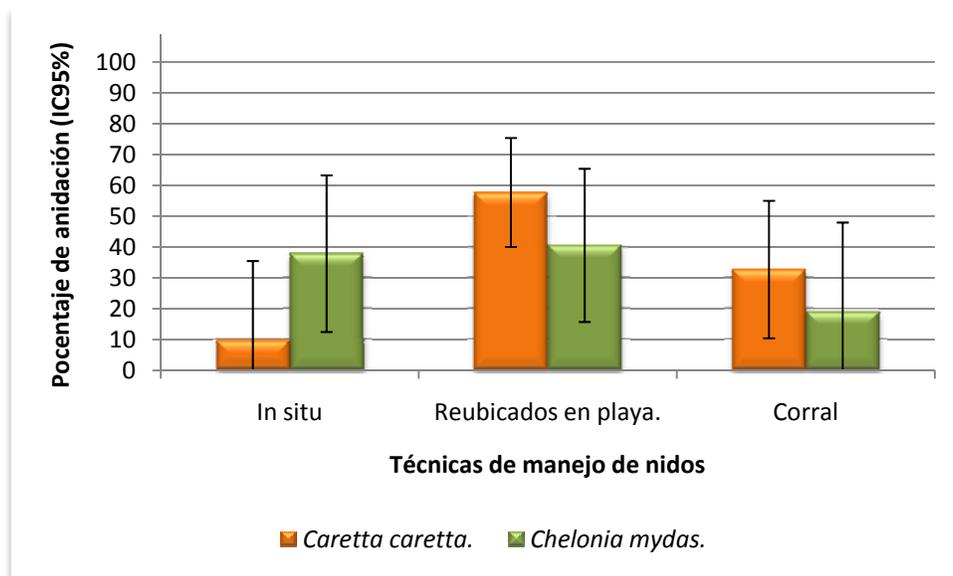


Se utilizó la técnica de **reubicación en playa** principalmente para *Caretta caretta* con 30 nidos (57.6%) (IC 95% 43-71%). En cuanto que para *Chelonia mydas* fueron 15 nidos (40.5%); (IC 95% 25-58%) y con un valor de  $p= 0.13$ . La técnica “**In situ**” correspondió a 5 nidos de *Caretta caretta* (9.6%); (IC 95% 3.2-21%) y 14 de *Chelonia mydas* (37.8%) (IC95% 22.5-55.2%) con una  $p= 0.001$  lo cual indica que sí son estadísticamente diferentes. En cuanto al **trasplante al corral de protección**, se manejaron 17 nidos de *Caretta caretta* (32.7%); (IC95% 20.3-47.1%) y 7 de *Chelonia mydas* (18.9%); (IC 95% 8-35.2%) con una  $p=0.2$  y lo cual indica que estadísticamente no son diferentes (Figura 6).

En el análisis estadístico por  $\chi^2$  se consideró a las tres técnicas de manejo para las dos especies, donde hay una diferencia significativa con un valor de  $p= 0.004$

La incubación en **caja de unigel** solo se utilizó como técnica de emergencia para un nido de *Chelonia mydas* que se encontró en riesgo por la tormenta tropical “*Ida*” que se presentó los primeros días de noviembre.

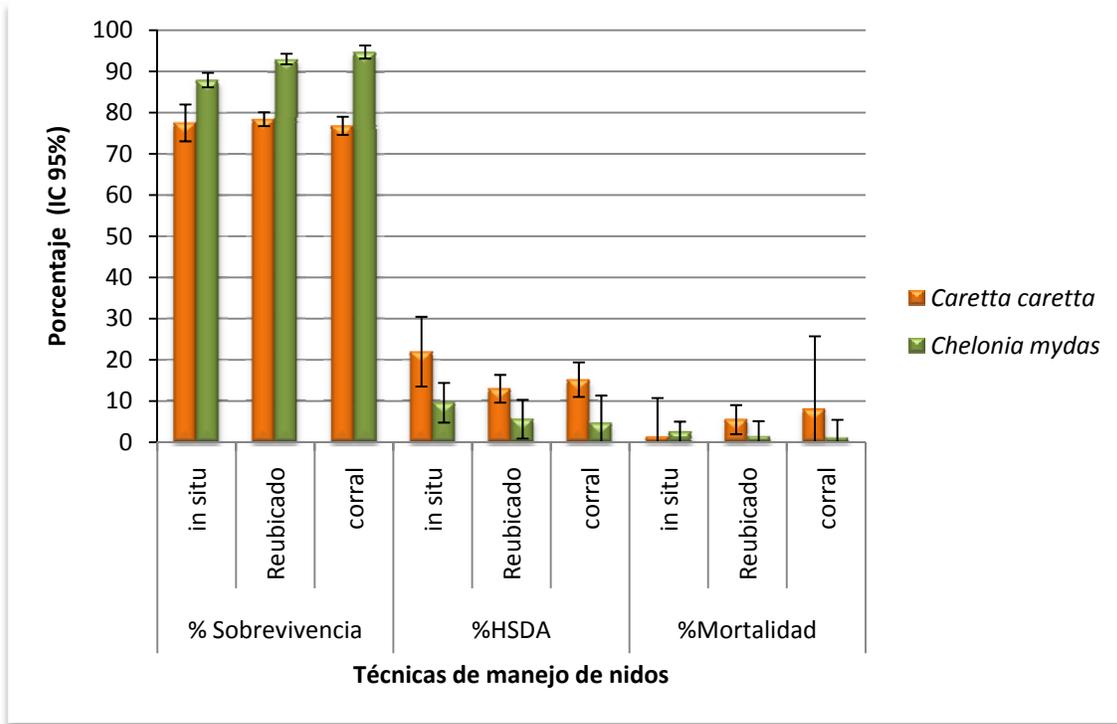
Figura 6. Relación de porcentaje de nidos (IC 95%) y las diferentes técnicas de manejo utilizadas en el Campamento Xpu Ha. Temporada 2009.



El total de sobrevivencia fue de un 77.8% para *Caretta caretta* y un 91.4% para *Chelonia mydas*, donde se observa que el porcentaje de sobrevivencia fue mayor para *Chelonia mydas*, el análisis estadístico muestra  $\chi^2$  (p= 0.000).

El porcentaje total de mortalidad y huevos sin desarrollo aparente (HSDA) para *Caretta caretta* fue de 22.2% (21.1-23.4%) y para *Chelonia mydas* 8.6 % (7.7-9.5%); al análisis de  $\chi^2$  (p= 0.000), Riesgo relativo (RR) de 2.5 (IC 95% 2.3-2.9) veces más probable de morir o ser huevo sin desarrollo si el huevo pertenece a una nidada de *Caretta caretta* que si pertenece a *Chelonia mydas*. Se analizó el porcentaje de sobrevivencia, de huevos sin desarrollo aparente (HSDA) y mortalidad con respecto al manejo recibido en cada nido: *In situ*, reubicado y corral (Figura 7). Se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de sobrevivencia entre especies donde *Caretta caretta* no importando el manejo recibido presentó un porcentaje >76.8% de sobrevivencia contra >87.9% en *Chelonia mydas*  $\chi^2$  (p= 0.000). El porcentaje de HSDA para *Caretta caretta* se observó en un rango de 13-22%, *Chelonia mydas* se observó entre 4.6-9.6%, el mayor porcentaje de HSDA se observó dentro de *Caretta caretta in situ* y en corral y fue estadísticamente diferente de *Chelonia mydas* reubicado, *in situ* o en corral  $\chi^2$  (p= 0.000).

Figura 7. Porcentaje total de sobrevivencia, mortalidad y huevos sin desarrollo aparente (HSDA) de la especie *Caretta caretta* y *Chelonia mydas*, dividida por técnicas de manejo. Campamento Tortuguero Xpu Ha, Temporada 2009.

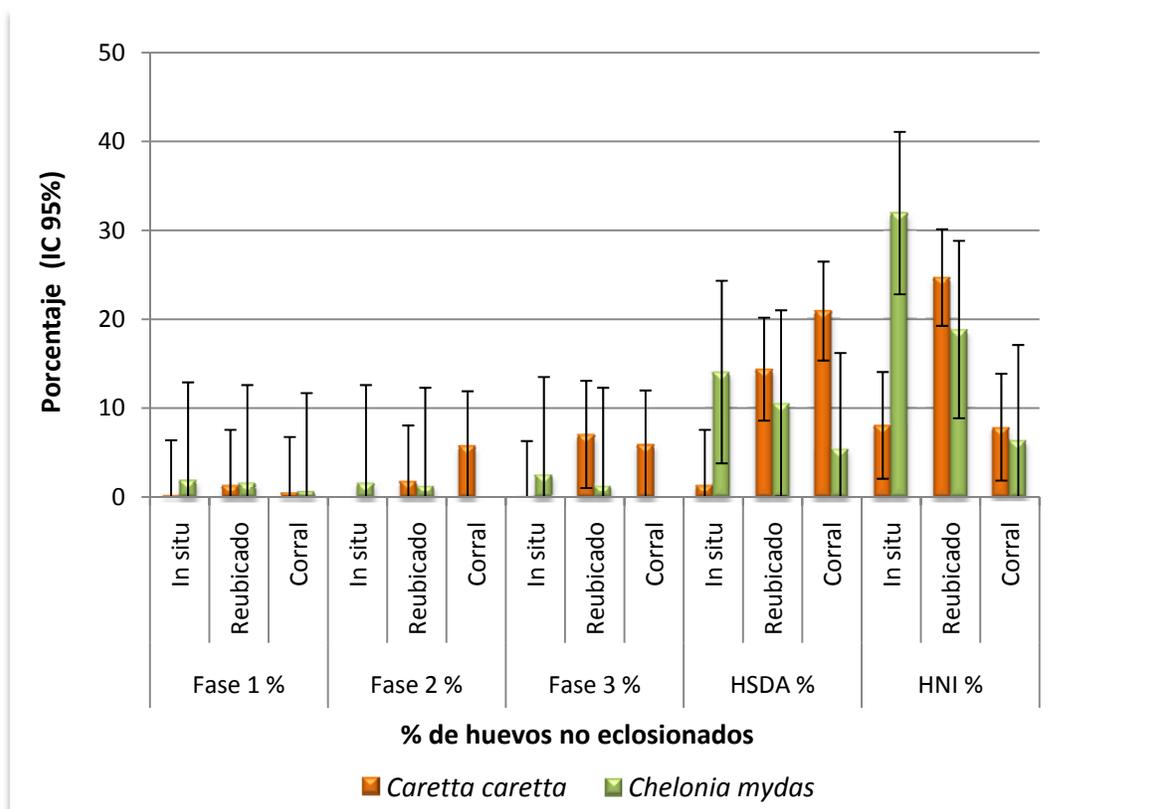


En cuanto a la fertilidad para *Caretta caretta* y *Chelonia mydas* fue de un total de 83.8 % (IC 95% 82.7-84.5%) y 93.2% (IC 95% 92.3-93.9%) respectivamente  $\chi^2$  (p= 0.000)

Para *Caretta caretta* con un total de 5,241 huevos, el 18% no eclosionó, lo que corresponde a 980 HNE (IC 95% 17.7-19.8%). Durante el análisis de estos, se observó que 20 se detuvieron en fase 1, 75 en fase 2 donde se obtuvieron 2 muestras para bacteriología, en fase tres se observaron 128 y se obtuvieron 10 huevos para muestras de bacteriología. Así mismo se registraron 359 HSDA y 398 HNI. El total de huevos para *Chelonia mydas* fue de 4,024, de estos 313 no eclosionaron lo que corresponde al 7.7%. (IC95% 7.0-8.6%). Al realizar el análisis se observó que en fase 1 se interrumpió el crecimiento de 13, con esto se logro obtener 3 huevos para muestra de bacteriología. En tanto para la fase 2 se detuvieron 9 y no se logro obtener ninguna muestra ya que la mayoría de estos se encontraban rotos o

con crías eclosionando muertas. En fase 3 se detuvieron 13 y se obtuvieron 8 huevos para muestra de bacteriología. Los HSDA resultaron ser 97 y HNI 181. En el análisis por  $\chi^2$  comparando el porcentaje de huevos no eclosionados totales entre ambas especies para las fases 1,2 y 3 comparadas con HSDA y HNI resulto estadísticamente significativo donde el mayor porcentaje corresponde a *Caretta caretta*. (p= 0.000), (Figura 8).

Figura 8. Porcentaje de huevos no eclosionados de *Caretta caretta* y *Chelonia mydas*, en relación al total de huevos protegidos, clasificados por las tres técnicas de manejo, utilizadas en el campamento tortuguero Xpu Ha, temporada 2009.



En el análisis estadístico por  $\chi^2$  cuando se trato de buscar diferencias estadísticamente significativas entre las tres fases de desarrollo de los huevos no eclosionados, HSDA y HNI dentro de las tres técnicas de manejo que se les dio a las nidadas se obtuvo un valor de ( $p=0.000$ ), donde las diferencias significativas se establecieron entre el bajo porcentaje de huevos que detuvieron su desarrollo en las fases 1, 2 o 3 indistintamente con los porcentajes de huevos analizados como HSDA y HNI (Figura 8).

En el análisis estadístico por  $\chi^2$  cuando se trato de buscar diferencias estadísticamente significativas dentro de cada una de las fases estudiadas en huevos no eclosionados comparando frecuencias entre técnicas de manejo y entre ambas especies de animales estudiados: se obtuvo lo siguiente: Fase 1 ( $p=0.06$ ), Fase 2 y 3 ( $p=0.00$ ), sin embargo, tanto para las fases 2 y 3 las frecuencias de huevos no eclosionados son muy bajas y aunque estadísticamente se marcan como significativas carecieron de potencia estadística. Utilizando el mismo modelo de estudio para los HSDA se obtuvo una  $\chi^2$  de 133.9 ( $p=0.000$ ) donde los porcentajes resultaron estadísticamente diferentes entre huevos que provenían de nidos que se mantuvieron in situ al compararse con los nidos en corral o reubicados para la especie *Caretta caretta* y sin diferencias entre manejos para la especie *Chelonia mydas*. Para los HNI se obtuvo una  $\chi^2$  de 74.8 ( $p=0.000$ ) donde los porcentajes resultaron estadísticamente diferentes entre huevos que provenían de nidos que se mantuvieron in situ y reubicados al compararse con los nidos en corral dentro de la especie *Chelonia mydas* y en el caso de *Caretta caretta* se obtuvo una diferencia entre los HNI de in situ y corral en comparación con los reubicados ( $p<0.05$ ), (Figura 8).

## 7.1. RESULTADOS BACTERIOLOGICOS

Se obtuvo un total de 23 huevos para muestra de los cuales 15 de ellos mostraron algún tipo de crecimiento bacteriano, se diferenciaron los tipos de colonias y con ello se obtuvo un total de 45 aislamientos (Cuadro 2). De estos al realizar la tinción de Gram se distinguió de aquellas bacterias Gram negativas y positivas, el porcentaje de cepas Gram negativas en *Caretta caretta* fue 63.3% (IC95% 43.9-80.1%) y para *Chelonia mydas* fue 86.6% (IC95% 59.5-98.3%), pero no fueron estadísticamente diferentes. Para las Gram positivas en *Caretta caretta* fue del 36.6% (IC95% 19.9-56.6%), para *Chelonia mydas* fue 13.3% (IC95% 1.7-40.5%) y no fueron estadísticamente diferentes. (Cuadro 3).

Cuadro 2. Tipos de Aislamientos bacteriológicos para las especies *Caretta caretta* y *Chelonia mydas*

Aislamientos				
Especie	Albúmina	Hígado	Líquido gástrico	Total
<i>Caretta caretta</i>	14	7	9	30
<i>Chelonia mydas</i>	7	4	4	15

Cuadro 3. Crecimientos bacterianos y resultados a la Tinción de Gram para las especies *Caretta caretta* y *Chelonia mydas*

<b>Bacteriología</b>					
<b>Especie</b>	<b>HM</b>	<b>Crecimiento Bacteriano</b>	<b>Aislamientos</b>	<b>Gram %</b>	
<i>Caretta caretta</i>	12	8	30 (12 géneros)	63.33 (-)	33.66 (+)
<i>Chelonia mydas</i>	11	7	15 (10 géneros)	86.66 (-)	13.33 (+)

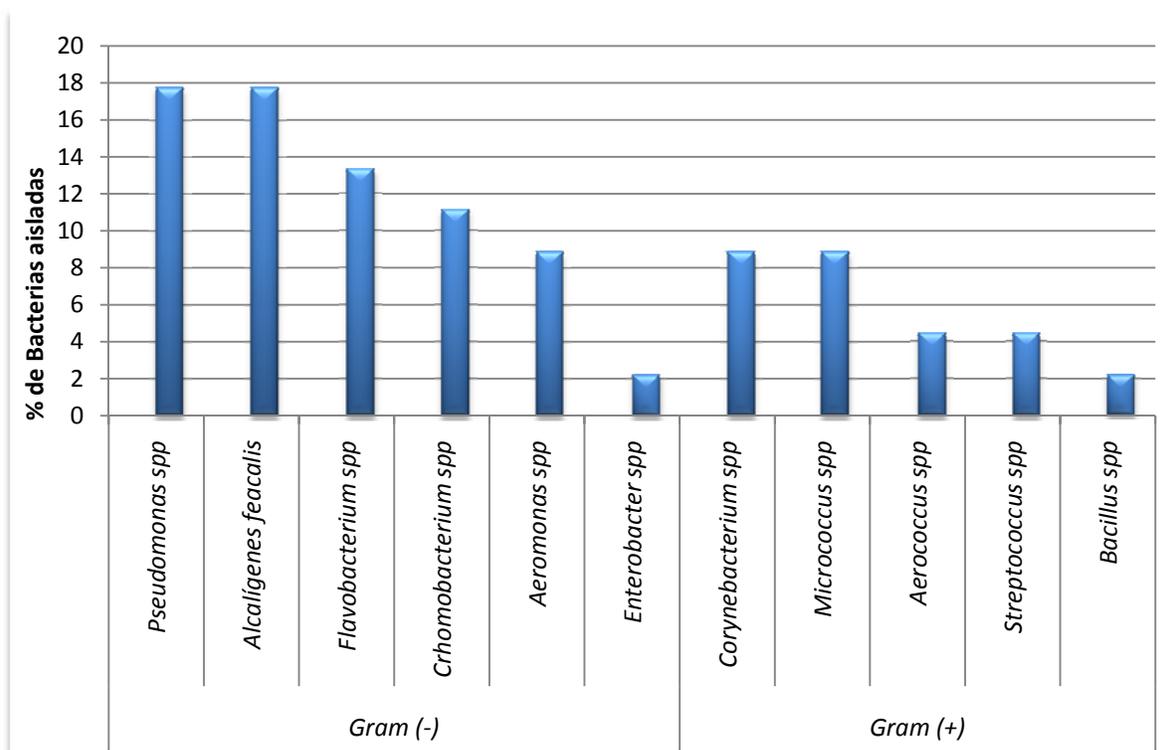
De los 23 huevos muestreados (HM): 3 de ellos se detuvieron en fase 1, 2 en fase 2 y 18 en fase 3. (Cuadro 4)

Cuadro 4. Fases de desarrollo de los Huevos Muestreados de las especies *Caretta caretta* y *Chelonia mydas*

<b>Distribución de Fases de embriones muestreados</b>			
<b>Especie</b>	<b>Fase 1</b>	<b>Fase 2</b>	<b>Fase 3</b>
<i>Caretta caretta</i>	0	2	10
<i>Chelonia mydas</i>	3	0	8

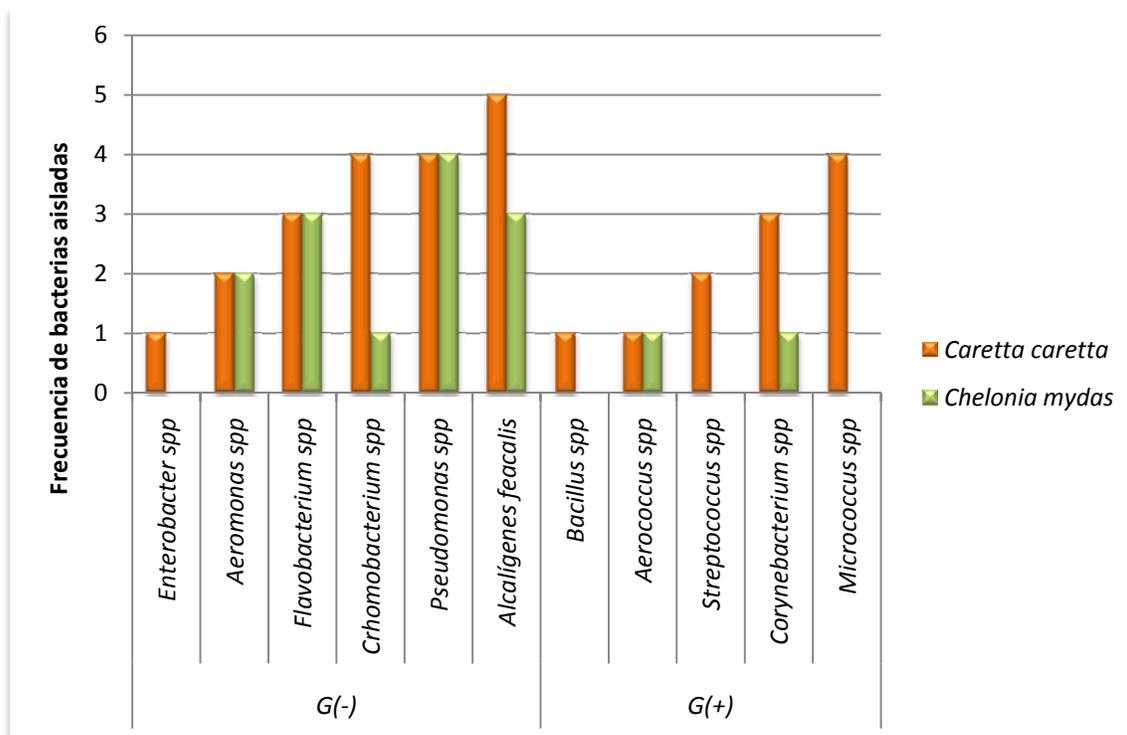
En cuanto al total general de bacterias aisladas se observó que el mayor porcentaje para Gram negativas fueron *Pseudomonas spp* (8/45) y *Alcaligenes faecalis* (8/45) con el 17.78% para cada una, seguido de *Flavobacterium spp* (6/45) el 13.3%, *Crhomobacterium spp* (5/45) 11.11%, *Aeromonas spp* (4/45) 8.89% y *Enterobacter spp* (1/45) 2.22%. Y para las Gram positivas el mayor porcentaje se observó en *Corynebacterium spp* (4/45) y *Micrococcus spp* (4/45) con el 8.89% para cada una, seguido de *Aerococcus spp* (2/45) y *Streptococcus spp* (2/45) con el 4.44% para cada una y *Bacillus spp* (1/45) con 2.22% (Figura 9).

Figura 9. Porcentaje de bacterias aisladas en huevos de tortuga marina *Caretta caretta* y *Chelonia mydas* divididas por Gram negativas y Gram positivas.



En géneros bacterianos por especie se encontró el mayor número de Gram negativas (19) y Gram positivas (11) para *Caretta caretta* y para *Chelonia mydas* fueron Gram negativas (13) y Gram positivas (2) (Figura 10 y cuadro 6).

Figura 10. Distribución y frecuencia de géneros bacterianos en huevos de tortugas marinas *Caretta caretta* y *Chelonia mydas*



La distribución del resultado de los aislamientos fue analizada dentro de cada especie, tipo de manejo y número de géneros bacterianos, donde el mayor número de Gram positivas y negativas se encontró en los huevos provenientes de nidos con reubicación en playa dentro de la especie *Caretta caretta* ( $p= 0.0003$ ) (Cuadro 5).

Cuadro 5. Número de aislamientos, divididos por técnicas de manejo en las dos especies de tortugas marinas.

<b>Bacteriología</b>			
<b>Especie</b>	<b>Tipo de manejo</b>	<b>Géneros bacterianos</b>	<b>Gram</b>
<i>Caretta caretta</i>	Corral	5	(2-) (3+)
	Reubicación en playa	24	(16-) (8+)
	<i>In situ</i>	1	(1-)(0+)
<i>Chelonia mydas</i>	Corral	0	0
	Reubicación en playa	4	(3-) (1+)
	<i>In situ</i>	11	(10-) (1+)

De los 45 aislados obtenidos el mayor porcentaje proviene de *Caretta caretta* y el menor a *Chelonia mydas*. 11 géneros de bacterias fueron aisladas, 6 pertenecientes a las Gram negativas dentro de las cuales esta *Pseudomonas spp*, *Enterobacter spp*, *Aeromonas spp*, *Alcaligenes Faecalis*, *Flavobacterium spp* y *Crhomobacterium spp*. Los aislamientos Gram positivos corresponden a 5 géneros dentro de los cuales están *Streptococcus spp*, *Corynebacterium spp*, *Bacillus spp*, *Aerococcus spp* y *Micrococcus spp*. Los aislamientos y su distribución de frecuencias por especie animal se presentan en el Cuadro 6.

**Cuadro 6. Bacterias aisladas a partir de diferentes muestras en huevos de tortuga marina  
*Caretta caretta* y *Chelonia mydas***

<b>Bacterias Aisladas</b>	<b><i>Caretta caretta</i> (%), (n)</b>	<b><i>Chelonia mydas</i> (%), (n)</b>
<i>Enterobacter spp</i>	(2.44%) (1)	0
<i>Aeromonas spp</i>	(4.88%) (2)	(9.09%) (2)
<i>Pseudomonas pseudomallei</i>	0	(4.55%) (1)
<i>Pseudomonas spp</i>	(4.88%) (2)	(4.55%) (1)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(4.88%) (2)	(9.09%) (2)
<i>Flavobacterium spp</i>	(7.32%) (3)	(13.64%) (3)
<i>Crhomobacterium spp</i>	(9.76%) (4)	(4.55%) (1)
<i>Aerococcus spp</i>	(2.44%) (1)	(4.55%) (1)
<i>Bacillus spp</i>	(2.44%) (1)	0
<i>Streptococcus spp</i>	(4.88%) (2)	0
<i>Corynebacterium spp</i>	(7.32%) (3)	(4.55%) (1)
<i>Micrococcus spp</i>	(9.76%) (4)	0
<i>Alcalígenes faecalis</i>	(12.20%) (5)	(13.64%) (3)
Muestras sin crecimiento	(26.81%) (11)	(31.82%) (7)

En el cuadro 7 se presenta el número y género de bacterias aisladas para cada especie, de acuerdo a la muestra de origen donde se obtuvo el aislado (Albúmina, Hígado, Líquido Gástrico). El mayor número de aislados proviene de albúmina en ambas especies donde se aislaron 8 géneros para la especie *Caretta caretta* con 13 aislados totales; para *Chelonia mydas* fueron 6 géneros con 7 aislados totales. Para hígado fueron 4 géneros dentro de cada especie animal, 7 aislados para *Caretta caretta* y 4 para *Chelonia mydas*. En el líquido gástrico se obtuvieron 5 géneros con 7 aislados para la especie *Caretta caretta*; para *Chelonia mydas* fueron 2 géneros con 4 aislados.

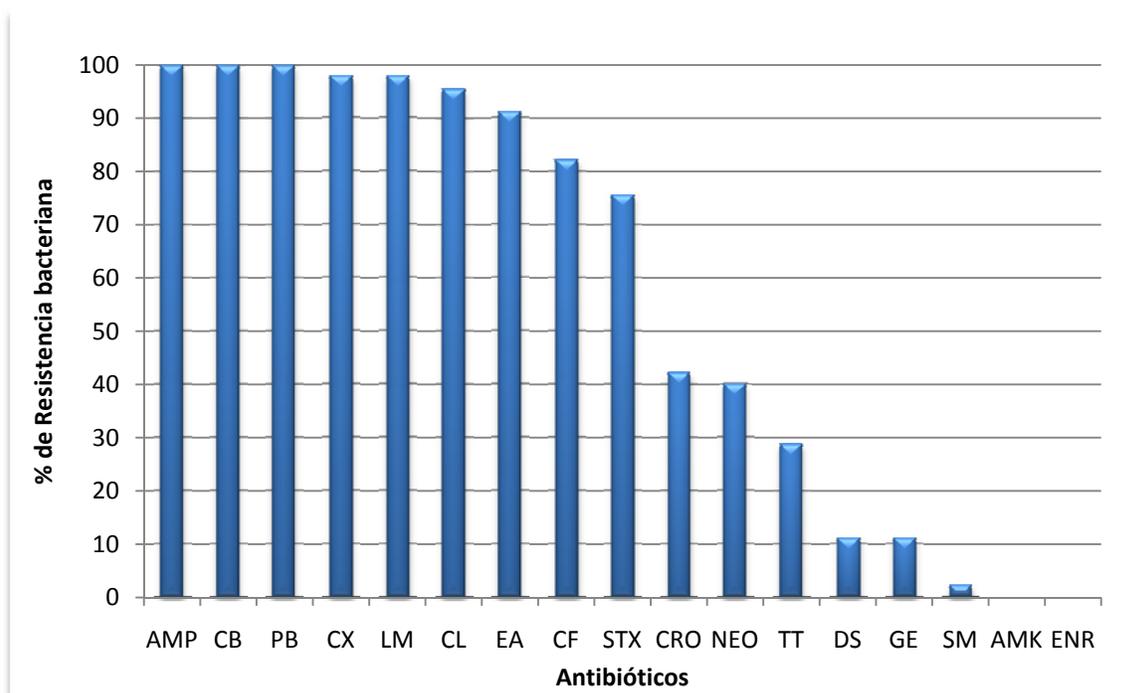
**Cuadro 7. Número y género de bacterias aisladas a partir de diferentes muestras de huevos de tortuga marina**

<b>Tipo de muestra</b>	<b><i>Caretta caretta</i></b>	<b><i>Chelonia mydas</i></b>
<b>Albúmina</b>	<i>Alcaligenes faecalis</i> (2)	<i>Alcaligenes faecalis</i> (2)
	<i>Crhomobacterium spp</i> (2)	<i>Crhomobacterium spp</i> (0)
	<i>Pseudomona aeruginosa</i> (1)	<i>Pseudomona aeruginosa</i> (1)
	<i>Pseudomonas spp</i> (1)	<i>Pseudomonas spp</i> (1)
	<i>Pseudomonas pseudomallei</i> (0)	<i>Pseudomonas pseudomallei</i> (1)
	<i>Aeromonas spp</i> (0)	<i>Aeromonas spp</i> (1)
	<i>Aerococcus spp</i> (1)	<i>Aerococcus spp</i> (0)
	<i>Corynebacterium spp</i> (2)	<i>Corynebacterium spp</i> (1)
	<i>Micrococcus spp</i> (2)	<i>Micrococcus spp</i> (0)
	<i>Streptococcus spp</i> (2)	<i>Streptococcus spp</i> (0)
	<i>Bacillus spp</i> (1)	<i>Bacillus spp</i> (0)
<b>Hígado</b>	<i>Alcaligenes faecalis</i> (1)	<i>Alcaligenes faecalis</i> (1)
	<i>Crhomobacterium spp</i> (2)	<i>Crhomobacterium spp</i> (1)
	<i>Pseudomona aeruginosa</i> (0)	<i>Pseudomona aeruginosa</i> (1)
	<i>Flavobacterium spp</i> (3)	<i>Flavobacterium spp</i> (0)
	<i>Aerococcus spp</i> (0)	<i>Aerococcus spp</i> (1)
	<i>Micrococcus spp</i> (1)	<i>Micrococcus spp</i> (1)
<b>Líquido Gástrico</b>	<i>Aeromonas spp</i> (2)	<i>Aeromonas spp</i> (1)
	<i>Alcaligenes faecalis</i> (2)	<i>Alcaligenes faecalis</i> (0)
	<i>Flavobacterium spp</i> (0)	<i>Flavobacterium spp</i> (3)
	<i>Enterobacter spp</i> (1)	<i>Enterobacter spp</i> (0)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (0)
	<i>Pseudomonas spp</i> (1)	<i>Pseudomonas spp</i> (0)
	<i>Corynebacterium spp</i> (1)	<i>Corynebacterium spp</i> (0)
	<i>Micrococcus spp</i> (1)	<i>Micrococcus spp</i> (0)

### 7.3. RESULTADOS DEL ANTIBIOGRAMA

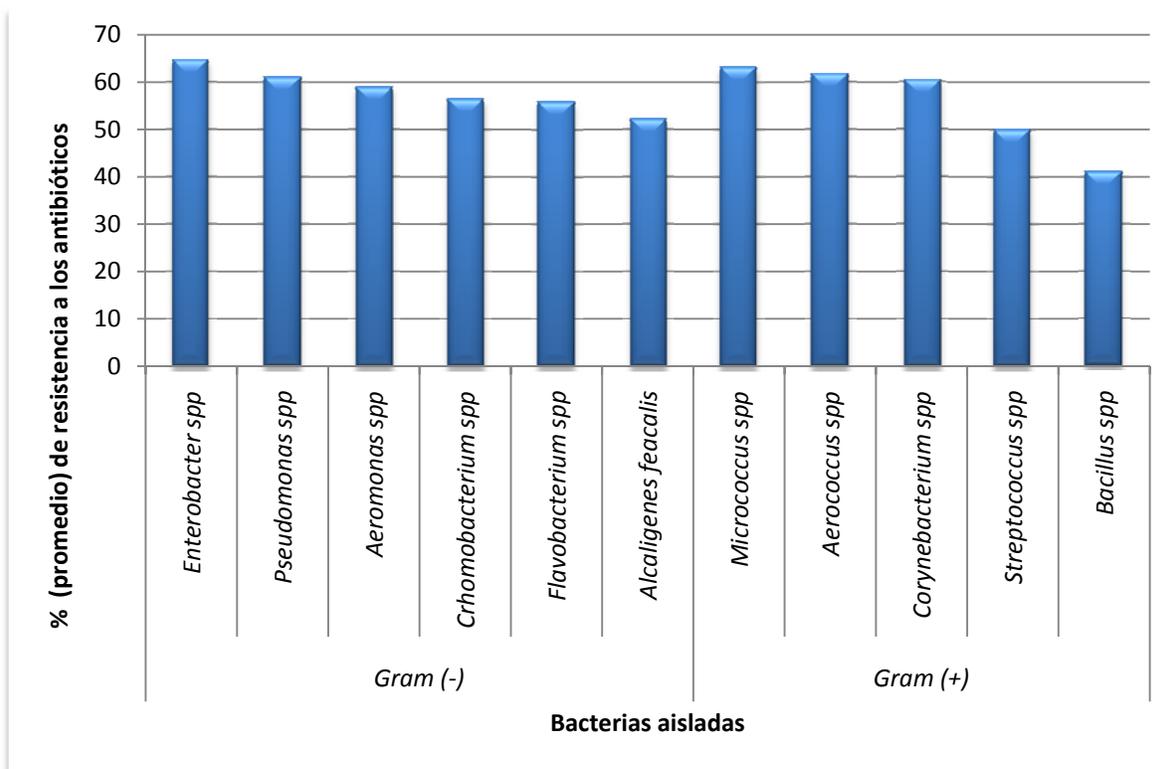
Dentro de los 45 aislados se encontró resistencia por lo menos a un antibiótico de los 17 antibióticos probados. Los porcentajes de aislamientos bacterianos resistentes a diferentes antibióticos, se muestran en la figura 11. Donde la ampicilina (AMP), la cloxacilina benzatínica (CB) y la penicilina benzatínica (PB) son los de resistencia más elevada, seguido de la cloxacilina sódica (CX) y la lincomicina (LM) que fue del 97.78%, así mismo para el cloramfenicol (CL) y la espiramicina de adipato (EA) se observó una resistencia  $>91.11\% <95.56\%$ . Para la cefalotina sódica (CF) y Sulfametoxazol trimetoprim (STX) una resistencia  $>75.56\% <82.22\%$ . Para la ceftriaxona sódica (CRO), la Neomicina (NEO) y las tetraciclinas (TT) se mostro una resistencia entre  $>28.89\% <42.22\%$ . La Dihidroestreptomicina (DS) y Gentamicina (GE) tuvieron el mismo porcentaje de resistencia del 11.11%, la estreptomicina (SM) tuvo el 2.22%. Y para la amikacina (AMK) y la enrofloxacina (ENR) no se observo resistencia bacteriana.

Figura 11. Porcentaje de resistencia bacteriana a antibióticos específicos. AMP: Ampicilina, CB: Cloxacilina Benzatínica, PB: Penicilina Benzatínica, CX: Cloxacilina Sódica, LM: Lincomicina, CL: Cloramfenicol, EA: Espiramicina de Adipato, CF: Cefalotina Sódica, STX: Sulfametoxazol/ Trimetoprim, CRO: Ceftriaxona Sódica, NEO: Neomicina, TT: Tetraciclina, DS: Dihidroestreptomicina, SM: Estreptomicina, AMK: Amikacina, ENR: Enrofloxacina.



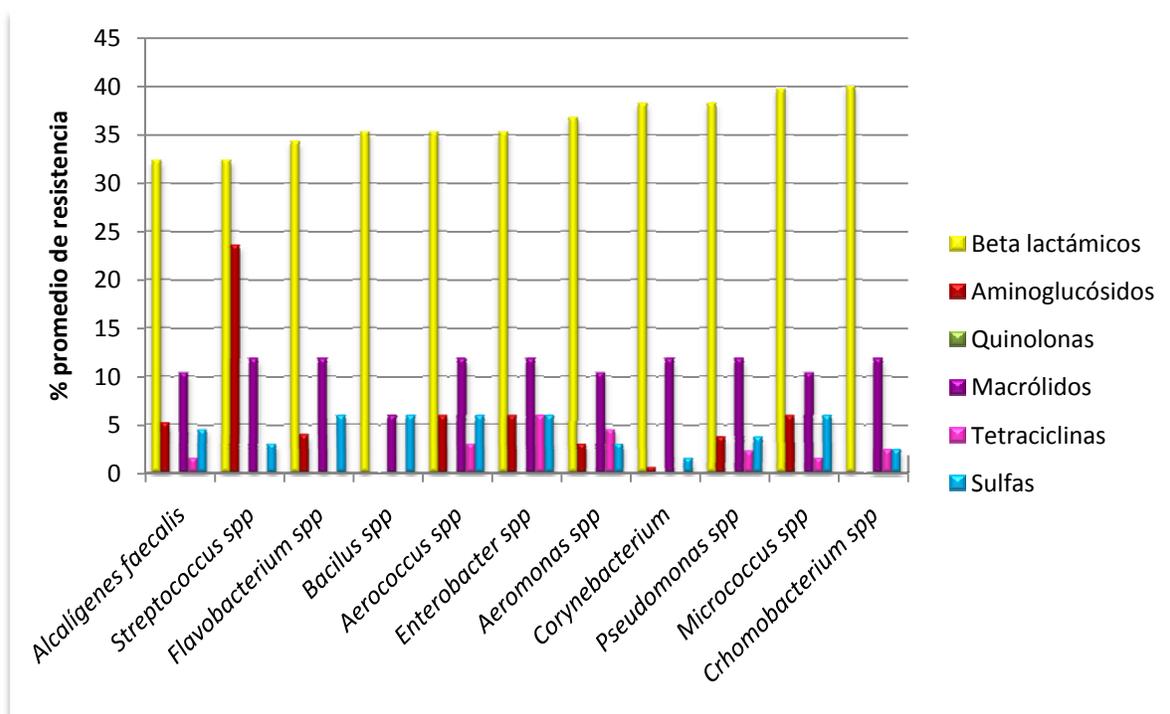
El porcentaje de la media del promedio de cada género dentro de aislamiento se muestra en la figura 12 donde para las Gram negativas *Enterobacter spp* muestra el mayor porcentaje de resistencia a antibióticos con el 64.71%, seguido de *Pseudomonas spp* con 61.03%, *Aeromonas spp* 58.82%, *Crhomobacterium spp* 56.47%, *Flavobacterium spp* 55.8% y *Alcaligenes faecalis* 52.21%. Para las Gram positivas *Micrococcus spp* 63.24%, *Aerococcus spp* 61.76%, *Corynebacterium spp* 60.29%, *Streptococcus spp* 50% y *Bacillus spp* con 41.18%

Figura 12. Resistencia a antibióticos en las diferentes cepas aisladas Gram negativos y Gram positivos para las dos especies de tortugas marinas.



El porcentaje de resistencia detectado para los diferentes grupos de antibióticos en base a su estructura química para los 11 géneros aislados se presenta en la figura 13. Los antibióticos beta lactámicos donde se encuentran las penicilinas y sus similares demostró el mayor porcentaje de resistencia en todos los géneros (> 30%); en segundo término se observaron resistencias a los antibióticos que pertenecen a los macrólidos (aprox 10%); las resistencias dentro de cada género aislado en aminoglicusidos, quinolonas, tetraciclinas y sulfas vario dentro de cada género de aislamientos, pero con valores inferiores al 10%.

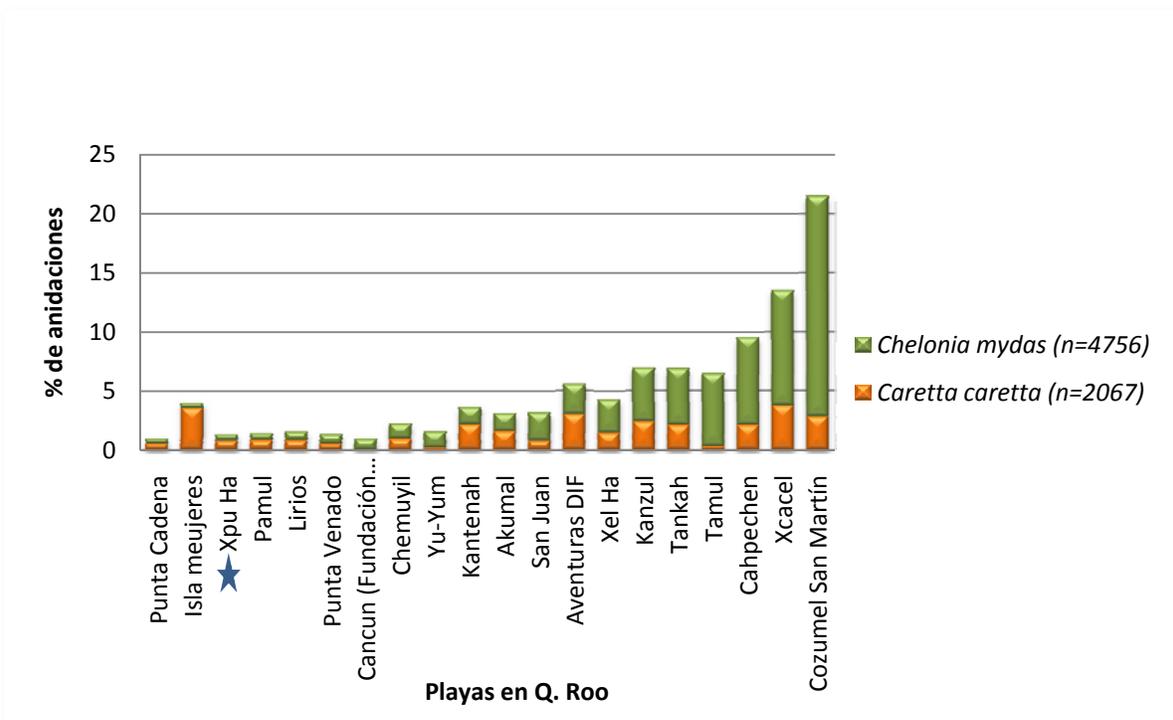
Figura 13. Resistencia a los diferentes grupos de antibióticos en cepas aisladas de huevos de tortugas marinas.



## 8. DISCUSIÓN

Para el presente estudio se tuvo acceso a los datos de anidación del año 2009 en 20 playas monitoreadas en el estado de Q. Roo (Comité estatal de tortugas marinas del estado de Q. Roo) (Figura 14). Se observó que para la especie *Caretta caretta* el mayor número fue para Xcacel con un total de 255 nidos, en tanto para la especie *Chelonia mydas* el mayor número de anidaciones fue para la Isla de Cozumel en la playa San Martín con un total de 1276 nidos. De las playas donde predominó *Caretta caretta* (n=7) sobre *Chelonia mydas* la razón entre ambas varió de 1 a 8. Y en las playas donde predominó *Chelonia mydas* (n=13) sobre *Caretta caretta* la razón entre ambas especies varió de 1 a 21. La playa de Xpu Ha donde se realizó el presente trabajo la razón fue 1.4, donde la especie predominante fue *Caretta caretta*.

Figura 14. Distribución de porcentaje proporcional de anidación entre especies (*Caretta caretta* y *Chelonia mydas*) en 20 playas del estado de Q. Roo, temporada 2009. Taller de Resultados; Comité estatal para la protección, conservación e investigación y manejo de la tortuga marina.



Zurita *et al.*, 2003 menciona que el censo de la población de nidos en la Península de Yucatán hacia la costa central del Estado de Quintana Roo, fue de 903 a 2,331 nidos, entre el período de 1983 a 2001 de *Caretta caretta*, donde se reporta satisfactoriamente un aumento en el número de nidos en siete playas de Quintana Roo. Sin embargo, desde el 2001 en previos reportes parece ser que el número de nidos han declinado y no tiene un sustento alguno.

La proporción entre especies varió entre playas y aunque en el estado de Q. Roo la anidación es predominante para *Chelonia mydas*, en el sitio de estudio (Xpu Ha) la especie predominante fue *Caretta caretta* para el año 2009, sin embargo la temporada del 2008 predominó en esta playa en particular *Chelonia mydas* (Figura 15). Si se consultan datos de anidación en forma anual se han reportado variaciones en la misma zona en el porcentaje de anidación entre especies. Esto se puede deber a que en las tortugas marinas los ciclos de reproducción son circanuales, es decir, se repiten en períodos anuales, bianuales o trianuales o en casos especiales se vuelven irregulares; esta frecuencia es de carácter específico, para la especie *Caretta caretta* generalmente es bianual y para la *Chelonia mydas* puede ser bianual o trianual (Márquez, 1996). El número de hembras anidadoras varía enormemente año con año por causas relacionadas a fenómenos ambientales poco comprendidas. Por lo anterior, es prioritario que algunos de los estudios sean capaces de diseñar y apoyar programas de seguimiento (Eckert L. *et al*, 2000; Troëng and Rankin, 2005).

En la temporada evaluada en el presente trabajo, el pico de las anidaciones general dentro del campamento fue de 62 nidos (69.6%), se registró entre los meses de junio a septiembre, siendo que para *Caretta caretta* se registró mayor anidación entre los meses de junio y julio con un total de 36 nidos (40.4%) de la anidación total para esta especie, mientras que para *Chelonia mydas* fue durante los meses de agosto y septiembre donde se registraron 26 nidos lo que significa el 29.2% de la anidación total de esta especie. La época de reproducción de la tortuga caguama *Caretta caretta* se ha reportado de mayo a septiembre en la costa del Atlántico y anida particularmente en nuestro país, en el estado de Quintana Roo. Para la tortuga blanca *Chelonia mydas* la anidación se distribuye desde Tamaulipas

hasta Quintana Roo y el período de mayor abundancia es entre junio y septiembre (Márquez, 1996).

Las estaciones dentro del área de estudio del presente trabajo que mayor actividad de anidación presentaron para ambas especies durante esta temporada fueron XP2 y XP5. Las cuales se caracterizaron por menor impacto antropogénico y el mayor ancho promedio de playa durante la temporada, favoreciendo las condiciones de anidación para ambas especies (Figura 2 y 5) la regionalización y monitoreo dentro de estas áreas geográficas establecidas en el campamento Xpu Ha se han utilizado desde el año 2000 lo que ha permitido tener datos demográficos comparativos que pudieran ser la base de un estudio retrospectivo comparativo (Maldonado G, 2008), (Figura 16). La división de la playa de anidación y definición del área de trabajo es uno de los componentes más importantes en el establecimiento de un programa de monitoreo a largo plazo para una playa de anidación. El área física de anidación debe conocerse, medirse, y mantener una consistencia en su acotación, para llevar a cabo un plan de manejo, todo esto con el fin de realizar comparaciones año con año (Eckert L *et al.*, 2000; Troëng and Rankin, 2005).

Figura 15. Nidos protegidos por especie año 2000 al 2009, Campamento Tortuguero Xpu Ha

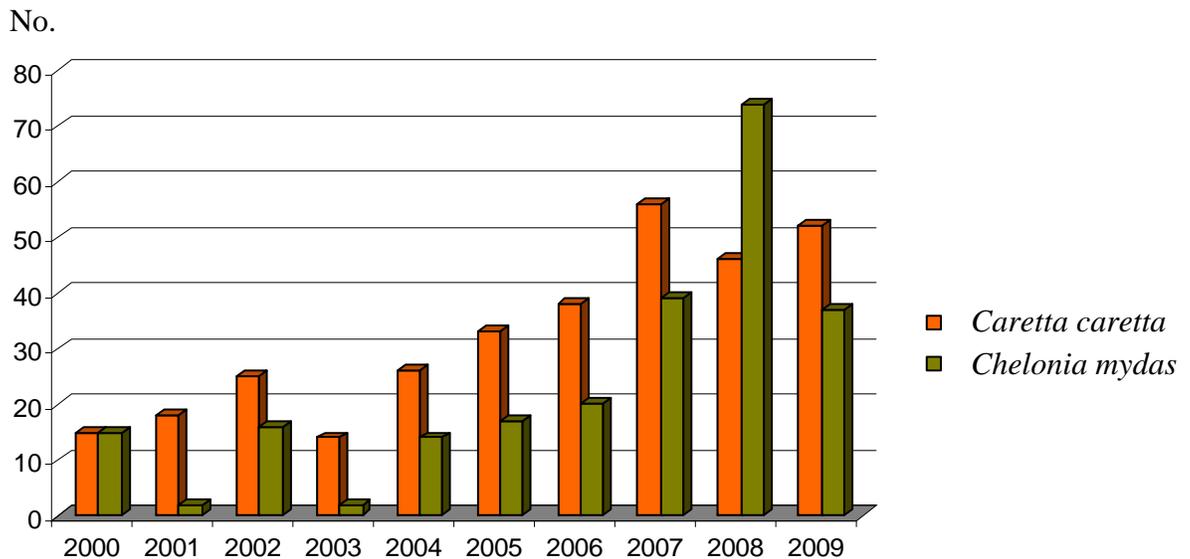
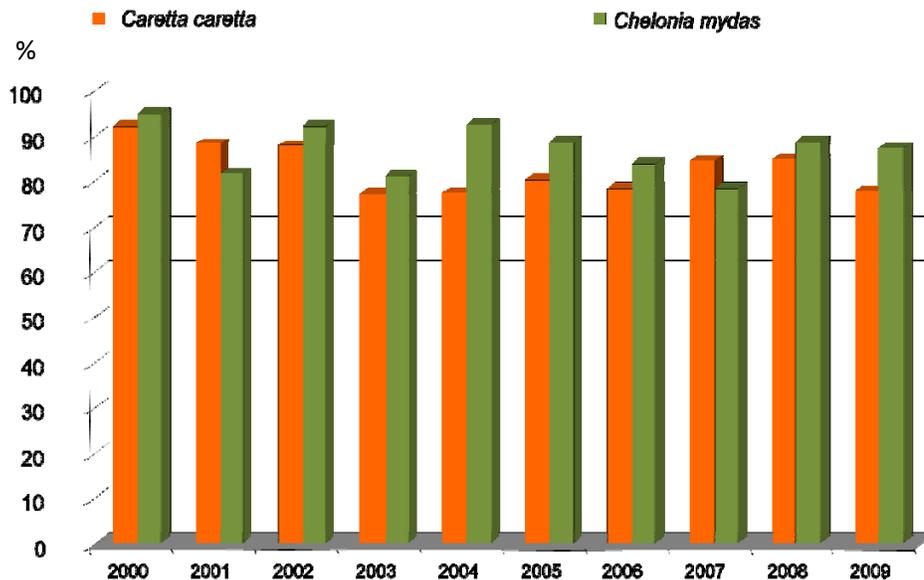


Figura 16. Porcentaje de sobrevivencia por especie en el Campamento Tortuguero Xpu Ha, año 2000 al 2009.



Chacon *et al.*, 2007 y R. Márquez, 1996 reportan que para las especies de tortugas marinas el promedio de huevos por nido de *Caretta caretta* es 104.1 (Dow *et al.*, 2007 y Fowler, 1977) y para *Chelonia mydas* 112 (Özdemir and Türkozan, 2005), en el presente estudio la media de huevos en los nidos para *Caretta caretta* fue del 100.7 y de *Chelonia mydas* fue de 108.7. Parámetros como el tamaño de la nidada, datos del porcentaje de sobrevivencia y mortalidad en las especies se pueden utilizar como indicadores de la abundancia, salud y equilibrio de las poblaciones en un ecosistema (Dow *et al.*, 2007).

La sobrevivencia fue diferente entre especies donde el mayor porcentaje se encontró en *Chelonia mydas* (>90%), Fowler (1979) señala un éxito de sobrevivencia de aproximadamente el 42% para *Chelonia mydas* en hábitats no protegidos con presencia de predadores (perros y otros carnívoros); Özdemir y Türkozan (2005) señalan una sobrevivencia mayor al 95% en las playas de Turquía en zonas protegidas y con manejo de corral de protección similar al presente trabajo. Mientras que para *Caretta caretta* se obtuvo un rango del 70 al 80%. Peters *et al.*, 1994; Christens, 1990; Wyneken *et al.*, 1988,

concuerdan con un porcentaje de sobrevivencia mayor al 77% para esta especie. Ambas especies se vieron expuestas a las mismas condiciones ambientales. Sin embargo, el manejo de los nidos varió entre especies, la especie *Caretta caretta* se manejó un total de 47 nidos de 52 totales (30 reubicados y 17 a trasplante a corral); Para *Chelonia mydas* se manejaron 32 nidos de un total de 37 (se reubicaron 15 y se trasplantaron 7 a corral). La razón de manejar los nidos fue el sitio de anidación donde la mayoría de ellos se ubicaron cerca de la primer berma para el caso de *Caretta caretta* (línea de marea alta), lo cual implica un riesgo de inundación y arenas muy compactas las cuales se ha demostrado tienen un impacto directo sobre sobrevivencia de la nidada (figura 3), en tanto los nidos de *Chelonia mydas* anidan más cerca de las dunas costeras, donde están sujetos con mayor probabilidad a humedad y a la microbiota presente en la zona de los humedales. Durante la incubación, donde los nidos quedan sujetos a numerosas amenazas bióticas como abióticas, inducido por causas humanas como naturales, por ejemplo la depredación, inundaciones y erosión de playas (Pritchard, 1980; Wyneken J, *et al* 1988; Frazer, 1992; Peters et al, 1994, Özdemir y Türkozan 2005).

Los huevos pueden ser reubicados donde puedan completar su desarrollo y producir crías viables. Blanck and Sawyer, 1981; Wyneken et al., 1988 reportan bajo desarrollo de los huevos en *Caretta caretta* asociándolo a diversas causas como: infertilidad, mortalidad embrionaria e invasión microbiana. La principal causa de mortalidad estudiada para los huevos en la nidada ha sido el impacto de depredadores (carnívoros nativos o ferales) y el consumo humano. Cuando la recolección de huevos es tan intensiva que alcanza el 100% de las nidadas el impacto sobre la población a corto plazo es drástico. Otro factor importante en la sobrevivencia es cuando los nidos son colocados por la hembra por debajo de la línea de marea, cerca de accesos a la playa, frente a edificaciones o sitios donde se haya identificado problemas de erosión, se justifica el uso de un corral de protección como una herramienta de conservación (Eckert L et al, 2001). Sin embargo, se debe promover la conservación *in situ*, esto es que los huevos queden en su nido natural. Las implicaciones de la relocalización de ellos son varias y de diferente grado de impacto, incluyendo la pérdida de su viabilidad. (Chacon *et al*, 2007)

En el presente estudio se evaluó la fertilidad, está en términos generales es importante como un monitor para la salud de las poblaciones. Para *Caretta caretta* fue de 83.8 % y de 93.2% para *Chelonia mydas* lo cual se considera como un rango reconocidos para estas especies de acuerdo a Bell A., *et al* 2003, donde mencionan que el promedio de fertilidad es de 93.3%. El número de huevos fértiles que pudieran ser evaluados dentro de las tres fases de desarrollo en el experimento no permitió evaluar diferencias estadísticas entre las tres fases o las dos especies ya que el número total de huevos en esta categoría no tuvo la suficiente potencia estadística. Los huevos sin desarrollo aparente (HSDA) representan aquellos que son producto de infertilidad o falta de desarrollo inicial, el mayor porcentaje de ellos se observó para *Caretta caretta* la cual a su vez tuvo el mayor porcentaje de nidos que fueron manejados por algún tipo de técnica y fue estadísticamente diferente de los huevos que se quedaron *in situ*. En tanto para *Chelonia mydas* el mayor porcentaje de HSDA se observó en los nidos *in situ*, los cuales se encontraban más cerca del borde de vegetación que de la línea de marea. Es característico el sitio en la playa que cada género escoge para anidar y parece estar relacionado con la talla y peso del animal. Lo cual implica que el impacto de infertilidad medido como HSDA pudiera estar asociado en primer lugar a la especie *per se* ya que es el comportamiento de la misma y que parece estar asociada a la elección del sitio de anidación. Para la tortuga *Chelonia mydas* el recorrido que realiza para anidar es mucho más largo, por lo general sube hasta la zona de la segunda berma, y casi nunca desova al primer intento, busca espacios libres de vegetación, en varias ocasiones recorre tramos de hasta 100 metros. En el caso de la *Caretta caretta* busca la situación intermedia, ya que anida al final de la primer berma y comúnmente al primer intento (Márquez, 1996). Las diferentes especies de tortugas marinas desarrollan la misma rutina durante la anidación, sin embargo, para que la incubación tenga éxito el nido debe ser construido más arriba de la línea de marea alta. (Figura 3).

Los huevos sin desarrollo aparente (HSDA) así como los huevos no identificados (HNI) son clasificados como infértiles, por esto último son contabilizados en otra categoría. Solo cuando se encuentran remanentes de sangre, o como tal un embrión visible se considera que el huevo era fértil (Blanck, C. E and R Sawyer, 1981).

El porcentaje de HNI representa huevos que pudieron haber sido fértiles o infértiles pero en los cuales hay evidencia de un proceso de descomposición siendo las causas más frecuentes de estos bacterias, hongos o algas contaminantes. El mayor porcentaje total de HNI perteneció a la especie *Chelonia mydas* en particular cuando los nidos permanecieron *in situ*, como ya se menciona antes, esta especie anidó preferentemente cerca del área de vegetación donde la composición de suelo tiene una mayor cantidad de materia orgánica y humedad, lo cual puede implicar una microbiota diferente comparada con los nidos que están en un sustrato más arenoso y cerca del borde marino, donde preferentemente anidó *Caretta caretta*. (Peters et al, 1994, Santoro M et al, 2003).

El porcentaje de mortalidad en este estudio para *Caretta caretta* se reporta del 1.2 al 8% dentro de los tres tipos de técnicas de manejo, *Chelonia mydas* del 1.1 al 3%, en dicha observación, al comparar los tres tipos de manejo no se observó diferencia estadística.

Es ampliamente conocido que la dinámica poblacional de las tortugas marinas denota altos niveles de mortalidad en sus estadios tempranos. Como respuesta a este fenómeno estos reptiles tienen un esquema reproductivo que les garantiza grandes cantidades de huevos lo que permite una producción significativa de neonatos. Los estudios de mortalidad mencionan que la proporción de sobrevivencia de estas especies es de un adulto por cada 1000 neonatos que alcanzaron el agua (1:1000). Debido a razones muy particulares como concentración de depredadores, fenómenos naturales y causas humanas esta proporción algunas veces es de 1:10,000 huevos (Chacon *et al*, 2007).

Existen diversos factores que influyen en la mortalidad de los embriones, tales como:

-  Humedad
-  Depredación
-  Factores de riesgo (naturales o antropogénicos)

Se justifica el uso de algún tipo de manejo como una herramienta de conservación cuando la recolección de huevos es tan intensiva que alcanza el 100% de las nidadas, cuando los actos depredadores derivados de humanos y animales domésticos son altamente frecuentes y cuando existen amagos de violencia contra los que desean realizar actividades de conservación, cuando los nidos son colocados por la hembra por debajo de la línea de

marea, cerca de accesos a la playa, frente a edificaciones o sitios donde se haya identificado problemas de erosión.

No se revisaron todos los nidos, ya que el tiempo de desarrollo de la investigación inició después del inicio de la temporada; el diseño sólo abarcó los meses de mayor actividad, por lo que se buscó que la cobertura de la zona diera una idea de la cantidad de nidos que hubo y de las posibles estrategias que se pueden aplicar para proteger un número mayor de nidos; a su vez que garanticen un mejor porcentaje de sobrevivencia y un mayor aporte de crías al stock natural.

El significado de la microbiota bacteriana que se puede encontrar en reptiles se entiende solo cuando se considera la interacción que existe entre los hospederos y el medio ambiente.

Según Santoro M, *et al*, los estudios de la microbiota bacteriana en animales de vida libre son de fundamental importancia pues permiten conocer el papel que juegan estos microorganismos en las enfermedades infecciosas y como afectan la supervivencia de las poblaciones de tortugas marinas en condiciones naturales dentro del equilibrio biológico de estos vertebrados. Considerando que el número de los microorganismos resulta mayor en reptiles con inestable estado de salud, pensamos que este aspecto puede ser utilizado como un importante índice para identificar grupos de animales inmunodeprimidos o enfermos, evaluando la flora bacteriana de una población durante varios años. El conocimiento de la flora natural de animales silvestres también es importante para entender los riesgos potenciales de la zoonosis.

Los resultados de este estudio demuestran que la microbiota bacteriana aerobia en huevos de las tortugas marinas *Caretta caretta* y *Chelonia mydas* fue la composición aparentemente normal e incluyen patógenos potenciales. Las bacterias halladas potencialmente patógenas no son sinónimos de enfermedad y pueden ser evaluados relativamente en el impacto en un grupo de animales considerando numerosas condiciones de estrés. Muchos de los microorganismos mencionados en este estudio son comúnmente considerados patógenos oportunistas (Santoro *et al.*, 2006).

Influencias ambientales y fuentes de contaminación muchas veces son consideradas en la interpretación del estudio de las mucosas de tortugas marinas. Muchas bacterias recuperadas de tortugas marinas son microorganismos comúnmente hallados en el ambiente, como en el mar o la arena de la playa. (Glazebrook *et al.*, 1993)

Al comparar los porcentajes de aislados dentro de cada especie animal, la proporción de Gram negativas es mayor y estadísticamente diferente que las de Gram positivas ( $p=0.00$ ); en tanto el porcentaje de Gram positivas y Gram negativas para la especie *Caretta caretta* no demostró ser estadísticamente diferente.

Los aislamientos de Gram negativos fueron; *Pseudomonas spp*, *Enterobacter spp*, *Aeromonas spp*, *Alcaligenes faecalis*, *Flavobacterium spp* y *Crhombacterium spp*, encontradas en este estudio y de las cuales las dos primeras han sido reportadas como patógenos en tanto las otras se consideran microbiota ambiental. Los aislamientos Gram positivos corresponden a 5 géneros dentro de los cuales están *Streptococcus spp*, *Corynebacterium spp*, *Bacillus spp*, *Aerococcus spp*, y *Micrococcus spp*, donde los 2 primeros se reconocen como potenciales patógenos y el resto como microorganismos ambientales.

En el presente estudio se examinó la frecuencia de la resistencia a antibióticos en cepas aisladas de huevos de tortuga marina. Los resultados del análisis sugieren la posibilidad hacia una alta incidencia de resistencia a antibióticos en el ambiente circundante.

Estos datos conducen a la postulación o asociación entre el incremento en la prevalencia de resistencia a antibióticos presentes en la microbiota de animales silvestres que se encuentran próximas a humanos o efectos antropogénicos (Gilliver *et al.*, 2001).

## 9. CONCLUSIONES

1. El porcentaje de mortalidad en este estudio para *Caretta caretta* se reporta del 1.2 al 8% y en *Chelonia mydas* del 1.1 al 3%, donde no se observó diferencia estadística.
2. En el 50% de los embriones muestreados el crecimiento se interrumpió en fase 3.
3. Las bacterias encontradas en los diferentes aislados de este estudio demuestran que la microbiota bacteriana aerobia en huevos de las tortugas marinas *Caretta caretta* y *Chelonia mydas* forman parte de la microbiota ambiental, sin embargo si incluyen patógenos potenciales como *Pseudomonas spp*, *Enterobacter spp*, *Streptococcus spp* y *Corynebacterium spp*.
4. Se demostró que la resistencia bacteriana fue de 4 hasta 11 antibióticos por cepa aislada.
5. La estación del año, la posición geográfica y el impacto antropogénico no repercutieron en la contaminación por bacterias, sin embargo, al movilizar o realizar el manejo de los nidos se provoca una alteración o cambio en la microbiota bacteriana. Así mismo, entre especies se observó que para *Caretta caretta* se realizó el mayor manejo con lo cual se especula el mayor número de géneros bacterianos.

## 10. APÉNDICE 1.

Formato de campo, utilizado para la identificación de especies anadoras en el Campamento Tortuguero Xpu Ha, temporada 2009.



**PROGRAMA INTEGRAL DE CONSERVACIÓN DE TORTUGAS MARINAS.**  
**CAMPAMENTO TORTUGUERO XPU-HA OFICIO No, SGPA/DGVS/03766/09**  
**FUNDACION PALACE RESORTS A.C Y FOMENTO ECOLÓGICO BANAMEX A.C.**



<b>Fecha:</b>		<b>Nido #:</b>		<b>Especie:</b>						
Tamaño nidada		Nido Tortuga Intento Arqueo	<b>Hora</b>		Zona de anidación	1	2	3		
Hvs.Colectados			Arribo	Estación		1	2	3	4	5
Hvs sembrados			Hora A.	Fact. R. nido		Inundado	Piedras	Raíces	Basura	
Téc. de campo			Hora B.	Fact. R. cama		Luces	Mesas	Personas	Palapas	
Destino/nido	Corral		"In situ"	Reubicad o	Caja					
<b>Marca</b>	<b>ADD</b>	<b>ADI</b>	<b>ATD</b>	<b>ATI</b>	<b>Marca viviente</b>		<b>Rastro</b>			
Aceros					 	Largo				
Cicatriz						Ancho				
LSC:		ASC:				Distancia a la vegetación				
<b>Foto identificación.</b>						<b>Comentarios:</b>				
Num.										
Sec.										
Técnico.					<i>C. mydas</i>	<i>C. caretta</i>				
Comentarios										

## **APÉNDICE 2.**

Formato de revisión y limpieza de nido de tortugas marinas. Campamento Tortuguero Xpu Ha, temporada 2009.



### APÉNDICE 3. Resultados del muestreo

Cuadro8. Nidos y huevos no eclosionados muestreados de <i>Caretta caretta</i> (Cc) y <i>Chelonia mydas</i> (Cm), comparando %, (IC95%) y Valor p del análisis estadístico por $\chi^2$																	
Nido		HP		CLV		CM		HNE		HCDA		HSDA		HNI		HM	
Cc	Cm	Cc	Cm	Cc	Cm	Cc	Cm	Cc	Cm	Cc	Cm	Cc	Cm	Cc	Cm	Cc	Cm
28	55	163	118	143	59	12	2	8	57	1	7	0	12	7	38	1	4
29	56	132	123	52	114	34	0	46	9	32	2	8	2	6	5	5	1
35	72	69	78	64	66	1	1	4	11	1	2	2	1	1	8	1	2
36	73	101	121	98	108	0	2	3	11	1	4	1	5	1	2	1	1
54	78	120	131	113	115	0	5	7	11	2	2	3	2	2	7	1	1
58	80	104	80	95	57	2	1	7	22	1	4	1	6	5	12	1	1
60	81	76	96	71	76	0	0	5	20	1	2	4	7	0	11	1	1
63		92		83		0		9		1		2		6		1	
n= 8	n= 7	857	747	719	595	49	11	89	141	40	23	21	35	28	83	12	11
%				83.9	79.6	5.7	1.4	10.3	18.8	4.6	3.0	2.4	4.6	3.2	11.1	1.4	1.4
IC 95%				81-86	77-82	4-7	1-3	8-13	16-22	3-6	2-5	1.5-3.7	3.3-6.5	2.2-4.7	8.9-13.6	0.7-2.4	0.7-2.6
$\chi^2$ , valor -p				0.03		0.000004		0.000		0.2		0.02		0.000		0.9	

**Nota:** HP: Huevos Protegidos, CLV: Crías Liberadas Vivas, CM: Crías Muertas, HNE: Huevos No Eclosionados, HCDA: Huevos Con Desarrollo Aparente, HSDA: Huevos Sin Desarrollo Aparente, HNI: Huevos No Identificados, HM: Huevos para Muestra, X: promedio. ( $\pm$  Error estándar de la media).

**APÉNDICE 4. Resultados de nidos muestreados**

Cuadro9. Nidos muestreados de <i>Caretta caretta</i> ( <i>Cc</i> ) y <i>Chelonia mydas</i> ( <i>Cm</i> ), comparando %, (IC95%) y Valor-p del análisis estadístico por $\chi^2$							
Nido		% Sobrevivencia		% Mortalidad		% HSDA	
<i>Cc</i>	<i>Cm</i>	<i>Cc</i>	<i>Cm</i>	<i>Cc</i>	<i>Cm</i>	<i>Cc</i>	<i>Cm</i>
28	55	87.7	50	8	7.6	4.3	44.2
29	56	39.4	92.68	50	1.6	10.6	6.1
35	72	92.8	84.61	2.8	3.8	4.3	11.3
36	73	.97	89.25	1	4.9	2	6.7
54	78	94.2	87.78	1.6	5.3	4.67	7.3
58	80	92.3	71.25	2.8	6.2	5.8	21
60	81	93.4	79.16	1.3	2.0	4	18.5
63		90.2		1.0		8.5	
n= 8	n= 7	83.9	79.2	8.5	4.48	5.6	6.4
IC 95%		81.3 – 86.3	76.6 - 82.5	2.5 - 14.5	3.65 - 5.31	4.4 - 6.8	11.6 - 21.2
$\chi^2$ , valor -p		0.03		0.0001		0.02	



## 12. BIBLIOGRAFÍA

1. Al-Bahry, S. N., Mahmoud, I.Y, Al-Harthy, A., Elshafie, A.E., Al-Ghafri, S.,Al-Bahry, A.,Alkindi. (2009). Bacterial flora and antibiotic resistance from eggs of green turtles *Chelonia mydas*: An indication of pulled effluents. Marine Pollution Bulletin Pp 720-724
2. Arnold N, Ovenden D. (2002) Reptiles y Anfibios. Guía de Campo.2ª Edición. Editorial Omega, Barcelona España.
3. Bell, A. B, R Spotila, V. F Paladino, D, R Reina, (2002). Low reproductive success of leatherback turtles, *Dermochelys coriacea*, is due to high embryonic mortality. University Philadelphia, USA. [www.elsevier.com/locate/biocon](http://www.elsevier.com/locate/biocon)
4. Blanck, C. E and R Sawyer, (1981). Hatchery practices in relation to early embryology of the loggerhead sea turtle, *Caretta caretta* (Linné). University of South Carolina, Columbia. U.S.A pp10.
5. Chacon D, Sánchez J, Calvo J y Ash J, (2007). Manual para el Manejo y Conservación de Tortugas Marinas en Costa Rica; con énfasis en la operación de proyectos en playas y viveros Sistema Nacional de Áreas de Conservación (SINAC), Ministerio de Ambiente y Energía (MINAE). Gobierno de Costa Rica. San José. P41.
6. Christens, E., (1990). Nest emergence lag of loggerhead sea turtles. J. Herpetology. 24: 400-4002.
7. Cowan S.T, (1974). Manual for the identification of medical bacteria. 2a edition. Cambridge University.
8. Díaz R, Gamazo C, López- Goñi I, (2004). Manual Práctico de Microbiología 2ª edición, Editorial Masson, Barcelona España.
9. Diesener G, Reichholf J. (1992). Reptiles y Anfibios, Editorial Blume. Barcelona España,
10. Dow W, K Eckert, M Palmer, P Kramer, (2007). An atlas of sea turtle nesting habitat for the wider Caribbean region. The wider Caribbean sea turtle. Conservation network and the nature conservancy. Widecast Technical Report No. 6. Beaufort, North Carolina.

11. Eckert L. K, Bjorndal A. K, Grobois F. A. A, Donnelly M, (2000). Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las Tortugas Marinas, Blanchard, Pensilvania, USA.
12. Fowler L, (1979). Hatching success and predation in the green sea turtle *Chelonia mydas*, at tortuguero. Costa Rica, Ecology 60: 946-955.
13. Frazer, N. B. (1992). Sea turtle conservation and halfway technology. Conserv. Biol. 6(2):179-184.
14. García, E, (1973). Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen, Instituto de Geografía. Universidad Nacional Autónoma de México. 1-246.
15. Gilliver, M., Bennett, M., Begon, M., Hazel, S., & Hart, C, (2001). Antibiotic resistance; How wild are wild mammals? Reply. Nature, 233-234.
16. Glazebrook, J. S. & 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.
17. Gobierno del estado (2009). Clima y precipitación pluvial del municipio de Benito Juárez, Quintana Roo. (En línea)  
<http://www.qroo.gob.mx/qroo/Estado/Solidaridad.php> Revisado: 16 de noviembre de 2009.
18. Maldonado G, (2008). Plan de Manejo Para Realizar Actividades de Aprovechamiento No Extractivo del Centro para la Protección y Conservación de la Tortuga Marina Xpu Ha.
19. Maldonado G., Herrera F. J, (2009). Reporte Final de Actividades del Campamento Tortuguero Xpu Ha. Pp. 45
20. Márquez R. (1996) Las tortugas marinas y nuestro tiempo. 3ª edición, editorial la ciencia para todos. México D.F.
21. Miller, J. D, (1985). Gans C, Billett F, Maderson P. Biology of the Reptilia. Vol 14, Interscience Publication, New York. Pp. 269-328.
22. NORMA Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo.

23. NORMA Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA-2002. Residuos Peligrosos Biológicos- Infecciosos. México.
24. Ortega LL, García VS, Cruz ST. (1990). Manual de Prácticas de Microbiología Veterinaria. México DF.
25. Osbaldiston, Ph, D.,B.V.Sc, (1973). Laboratory Procedures in Clinical Veterinary Bacteriology. University Park Press. Pp 29-59
26. Özdemir A., O. Türkozan., O. Güclu (2008). Embryonic mortality in Loggerhead Turtle (*Caretta caretta*) Nest: A Comparative Study on Fethiye and Göksu Delta Beaches. Turk J Zool 32: 287-292.
27. Perrault A, Fontaubert C, Hunter D, Namnun S, Bagley T. Convención Interamericana para la protección y Conservación de las Tortugas Marinas (CIT) Una Introducción, Publicado por la Convención Interamericana de Protección y Conservación de Tortugas Marinas, Costa Rica, 2003.
28. Peters A, J. Verhoeven, H. Strijbosh, (1994) .Hatching and emergence in the turkish mediterranean loggerhead turtle, *caretta caretta*: natural causes for egg and hatchling failure. Herpetology 50: 369-373.
29. Prats G. (2005) Microbiología Clínica. Editorial Panamericana. Madrid España.
30. Pritchard, P. C. H. (1980). The conservation of the sea turtles: Practice and problem. Am Zool, 20: 609-617.
31. Quinn P J, Carter M E, Markey B K, Carter G R. (1994). Clinical Veterinary Microbiology. Wolfe Publishing. Oxford UK.
32. Quinn P J, Carter M E, Markey B K, Donnelly W. J and Leonard F C. (2002) Veterinary Microbiology and Microbial Disease. Blackwell Publishing. Oxford UK.
33. Rice, E.W., Messer, J.W., Johnson, C.H., Reasoner, D.J., (1995). Occurrence of high-level aminoglycoside resistance in environmental islots of enterococci. Applied and environmental microbiology 61: 374-376.
34. Ruiz, A., M. Díaz y R. Merel. (2007). WIDECAS T Plan de Acción para la Recuperación de las Tortugas Marinas de Panamá (H. J. Guada, Editora). Informe Técnico del PAC No. 47. UNEP Caribbean Environment Programme, Kingston. 113 pp.

35. S. Wayne Martín, Meek A H y Wilieberg P. (2006) Veterinary Epidemiology Principles and Methods. Editorial Iowa State Univerity Press, Ames Iowa.
36. Santoro M, G.G. Hernández, M. S. Caballero., F. García. (2006) Aerobic bacterial flora of nesting green turtles (*Chelonia mydas*) from tortuguero national park, Costa Rica. Journal of Zoo and Wildlife Medicine. Pp 549-552.
37. Santoro M, M. C. Orrego., G. G Hernández., (2006) Flora bacteriana cloacal y nasal de *Lepidochelys olivácea* (Testudines: Cheloniidae) en el pacífico norte de Costa Rica. Revista de Biología Tropical. 54: 43-48.
38. Sarti L, Huerta P, Vasconcelos D. (2006). Manual de Técnicas de Protección de Tortugas Marinas, IFAW, Kutzari, WWF.
39. Silbergeld 2008, J. M. Rose, Gast J, Bogomolni A, Ellis C, Lentell3 B, Touhey K & Moore M Ocurrence and patterns of antibiotic resistance invertebrates of the Northeastern Unites States coast, USA pp. 1-11.
40. The sea turtles. For more than 100 million years marine turtles have covered vast distances across the world's oceans, performing a vital and integral role in marine and coastal ecosystems.  
[http://www.panda.org/es/acerca/hacemos/especies/tortugas\\_marinas/situacion actual/](http://www.panda.org/es/acerca/hacemos/especies/tortugas_marinas/situacion_actual/): Revisado: 13 de enero de 2010.
41. Tröeng S., Rankin E, (2005). Long-term conservation efforts contribute to positive green turtle *Chelonia mydas* nesting trend at tortuguero, Costa Rica. Biological conservation. 121: 111-116.
42. Wyneken J., T Burke., M. Salomon., and D. K. Pedersen (1988). Egg failure in natural and relocated sea turtle nest. Journal of Herpetology 22: 88-96
43. Zurita, J. C., R Herrera., A. Arenas, M.E. Torres, C. Calderón, L. Gómez, J. C. Alvarado, and R. Villavicencio (2003). Nesting loggerhead and green sea turtles in Quintana Roo, México. Pages 125-127 in Seminoff, J. A (complier). Proceedings of the Twenty-second Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation. NOAA Technical Memorandum NMFS- SEFSC-503.