Caracterización de bacterias aerobias de hisopados orales y cloacales del caimán del Orinoco (*Crocodylus intermedius*)

America Jaimes

Supervisor: María Alexandra García-Amado

Introducción

El crecimiento de asentamientos humanos en ecosistemas naturales puede introducir bacterias patógenas que alteran la microbiota de la fauna silvestre. El caimán del Orinoco (*Crocodylus intermedius*) es una especie en peligro crítico de extinción (CR) según UICN (UICN 2016). En Venezuela existe un programa de conservación para *C. intermedius*, el cual ha liberado más de 10.000 individuos a la naturaleza sin determinar la presencia de patógenos. En la actualidad las poblaciones de *C. intermedius* están disminuyendo y los asentamientos humanos siguen creciendo cerca de las poblaciones remanentes donde aún habita la especie, encontrando zonas de simpatría humano-cocodrilo lo que aumenta las probabilidades de encuentros y accidentes lo cual es un posible riesgo de transmisión de patógenos o infecciones zoonóticas.

Existen pocos estudios sobre microorganimos en réptiles, en particular para la familia Crocodilidae, en donde sólo 5 especies han sido estudiadas, en las cuales se han aislado bacterias como *E. coli*, *Aeromonas*, *Citrobacter*, *Pseudomonas* y *Klepsiella* (Huchzermayer, 2000; Cupul-Magaña, et al., 2005, Charrau et al., 2012). Estudiar la comunidad de bacterias asociadas al caimán del Orinoco permitirá conocer su estado de salud y determinar cómo puede afectar su supervivencia. Adicionalmente, la comparación de la comunidad bacteriana entre poblaciones silvestres con diferentes grados de disturbio antrópico podría mejorar nuestra comprensión de la microbiota en el proceso digestivo de *C. intermedius* y nuestros resultados podrían aportar conocimiento al programa de conservación.
En Venezuela no se han reportado registros de la microbiota presente en cavidad oral y cloacal de *Crocodylus intermedius*, tampoco existe información de las especies bacterianas presentes en el tracto gastrointestinal. En vista que en Venezuela no se tiene conocimiento sobre los microorganismos de *Crocodylus intermedius*, nuestro objetivo fue comparar bacterias de hisopados orales y cloacales de *C. Intermedius* provenientes de poblaciones silvestres con alta (río Cojedes) y baja (río Capanaparo) intervención humana.

Metodología

Este estudio se llevó a cabo en dos localidades: el río Capanaparo en el estado Apure, que se identifica como un lugar con baja actividad humana, y el Río Cojedes, estado Cojedes, convirtiéndose en la zona intervenida debido a la presencia de varios asentamientos humanos a lo largo del río. De cada localidad se capturaron 2 ejemplares talla II, obteniendo hisopados orales y cloacales de cada uno para realizar cultivo bacteriológico, aislamiento y tinción de Gram.

Las muestras de cavidad oral y cloacal se tomaron (por triplicado) en el campo empleando hisopos estériles, posteriormente los hisopos se colocaron en tubos de 1.5 ml con caldo Brucella y glicerol, y congelados en un tanque de nitrógeno líquido hasta llegar al laboratorio en el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas en donde fueron almacenados a -80°C.

El cultivo bacteriano se realizó utilizando tres diferentes medios: Agar Mac Conkey, Agar Sangre y Agar Nutritivo. Cada hisopado en caldo Brucella, se agitó a 6000 rpm x 50 seg para desprender las bacterias y de allí se tomar 100 µL para sembrar con un rastrillo en la placa de cada medio e incubar

a 37°C por 72 horas para el posterior aislamiento de colonias bacterianas. A todos los aislados se les realizó una tinción Gram.

La identificación bacteriana se realizó mediante secuenciación de gen *16S ARNr*. Para ello se extrajo el ADN (Barghouthi 2011) y se realizó una PCR con un juego de cebadores (8F y 1525R) que amplifican una región específica para bacterias (Contreras *et al* 2007). El producto de PCR fue secuenciado utilizando el servicio de Macrogen, Korea (http://dna.macrogen.com/eng/index.jsp). Las secuencias obtenidas fueron comparadas con secuencias de la base de datos del GenBank usando el programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Posteriormente se comparó las especies bacterianas obtenidas en las dos poblaciones con la finalidad de determinar si existen diferencias entre ellas.

Resultados

En el rio Cojedes se obtuvieron un total de 73 aislados, de los cuales 36 pertenecían a la cavidad oral y 37 a la cavidad cloacal. En el río Capanaparo se obtuvieron un total de 68 aislados, de los cuales 38 pertenecían a la cavidad oral y 30 a la cavidad cloacal. Los aislados se pudieron clasificar por localidad, morfología y tinción de Gram (Tabla 1).

En el río Cojedes, del total de los aislados, se lograron identificar 28/36 en cavidad oral y 32/37 en cloaca; de los cuales según su morfología, se identificaron en cavidad oral: cocos Gram positivos (2/28) que pertenecían al género *Staphylococcus* sp.; bacilos Gram positivos (21/28) y bacilos Gram negativos (5/28). En cloaca, se identificó de los cocos Gram positivos (1/32), perteneciente al género *Streptococcus* sp., bacilos Gram positivos (20/32) y bacilos Gram negativos (11/32).

En el Río Capanaparo, se identificaron 30/38 aislados en cavidad oral y 25/30 en cloaca, que según sus características morfológicas y de tinción se identificaron en cavidad oral: los cocos Gram positivos perteneciente al género *Staphylococcus* sp. (1/30), bacilos Gram positivos (15/30), bacilos Gram negativos (14/30) y en cloaca se identificaron cocos Gram positivos (2/25), asociados a los géneros *Staphylococcus* sp. y *Streptococcus* sp., bacilos Gram positivos (6/25) y bacilos Gram negativos (17/25).

Del total de bacterias identificadas en la cavidad oral en el Río Cojedes mediante la secuenciación del gen *16S ARNr*, se encontró que de los bacilos Gram negativos (n=5), los géneros identificados fueron *Enterobacter* sp. 40%, *Morganella* sp. 20%, *Erwinia* sp. 20% y *Ralstonia* sp. 20%. En cuanto a los bacilos Gram positivos (n=21), los géneros identificados fueron *Bacillus* sp. 90%, *Fictibacillus* sp. 5% y *Lysinibacillus* sp. 5%. En cloaca de los ejemplares del Río Cojedes, las bacterias identificadas por secuenciación fueron de los bacilos Gram negativos (n=11), los géneros encontrados fueron *Morganella* sp. 27%, *Enterobacter* sp. 27%, *Ralstonia* sp. 27%, *Brevundimonas* sp. 9% y *Acinetobacter* sp. 9%. En cuanto a los bacilos Gram positivos (n=20), los géneros identificados fueron *Bacillus* sp. 85%, *Fictibacillus* sp. 10% y *Lysinibacillus* sp. 5%.

Tabla 1: Números de aislados en cavidad oral y cloacal de 4 caimanes provenientes del sistema de rio Cojedes y rio Capanaparo con clasificación según morfología y tinción.								
LOCALIDAD	**CAVIDAD**	**TINCIÓN**	**COCOS**	**BACILOS**	**ESPIRILOS**	**FILAMENTOS**	**COCO-BACILOS**	**TOTAL**
RIO COJEDES	**ORAL**	GRAM POSITIVOS	3	22	1	-	-	**26**
		GRAM NEGATIVOS		7	1	-	2	**10**
		TOTAL	**3**	**29**	**2**	**-**	**2**	**36**
	CLOACA	GRAM POSITIVOS	2	23	-	-	-	**25**
		GRAM NEGATIVOS	1	11	-	-	-	**12**
		TOTAL	**3**	**34**	-	-	-	**37**
RIO CAPANAPARO	**ORAL**	GRAM POSITIVOS	1	16	-	-	-	**17**
		GRAM NEGATIVOS	1	15	-	2	3	**21**
		TOTAL	**2**	**31**		**2**	**3**	**38**
	CLOACA	GRAM POSITIVOS	3	6	-	-	-	**9**
		GRAM NEGATIVOS	-	21	-	-	-	**21**
		TOTAL	**3**	**27**	**-**	**-**	**-**	**30**

En el Río Capanaparo, en cavidad oral las bacterias identificadas mediante la secuenciación del *gen 16S ARNr*, los bacilos Gram negativos (n=14), se encontraron los géneros *Morganella* sp. 43%, *Stenotrophomonas* sp. 29%, *Providencia* sp. 14%, *Enterobacter* sp. 7% y *Flavobacterium* sp. 7% y de los bacilos Gram positivos (n=15), los géneros encontrados fueron *Bacillus* sp. 86%, *Gordonia* sp. 7% y *Fictibacillus* sp. 7%. En cloaca de los ejemplares de Río Capanaparo, respecto a las bacterias identificadas mediante secuenciación, de los bacilos Gram negativos (n=17), los géneros identificados fueron *Providencia* sp. 47%, *Stenotrophomonas* sp. 24%, *Morganella* sp. 11%, *Salmonella* sp. 6%, *Ochrobactrum* sp. 6% y *Acinetobacter* sp. 6% y de los bacilos Gram positivos (n=6), se identificaron los géneros *Bacillus* sp. 66%, *Gordonia* sp. 17% y *Arthrobacter* sp. 17%.

Conclusiones

Este es el primer reporte de la comunidad bacteriana en cavidad oral y cloacal de *Crocodylus intermedius* de dos poblaciones silvestres con alta y baja intervención humana en Venezuela, lo cual significa un hallazgo significativo y un aporte esencial para promover este tipo de investigaciones en la nación permitiendo conocer los aspectos microbiológicos del caimán del Orinoco.

Nuestros resultados muestran diferencias en la diversidad y abundancia bacteriana al comparar en ambas localidades. Lo cual sugiere que la actividad humana podría estar alterando la comunidad bacteriana de *Crocodylus intermedius.* Sin embargo, se necesitan más estudios microbiológicos a largo plazo que incluyan la calidad bacteriológica del agua para poder confirmar nuestros resultados. En ambas localidades se observaron la presencia de patógenos bacterianos de origen humano como *Enterobacter* sp., *Morganella* sp y *Salmonella* sp., los cuales pueden presentar un riesgo potencial para los asentamientos humanos cercanos a los ríos donde habitan estos caimanes.

Referencias

Barghouthi 2011. A Universal Method for the Identification of Bacteria Based on General PCR Primers. Indian Journal of Microbiology 51(4): 430-444.

Charrau, P., Perez, J., Perez, J.G., Cedeño, J., and Rosas, R. 2012. Oral and cloacal microflora of wild crocodiles *Crocodylus acutus* and *C. moreletii* in the Mexican Caribbean. Diseases of Aquatic Organisms 98: 27-39.

Contreras, M., Morales, A., García A., M., De Vera, M., Bermudez, V., and Gueneau, P. 2007. Detection of *Helicobacter*-like DNA in the gastric mucosa of Thoroughbred horses. Journal Compilation a 2007 The Society for Applied Microbiology, Lett. Appl. Microbiol. 45: 553-557.

Cupul-Magaña, F. 2005. La mordida del Cocodrilo Americano (*Crocodylus acutus*) ¿es potencialmente séptica? Revista de Biomedicina 65-67.

Huchzermayer, F., Henton, R. and Agnanagna, M. 2000. Aerobic Intestinal Flora of Dwarf Crocodiles. Onderstepport Journal of Veterinary Research 67: 201-204.

IUCN. 2016. Crocodile Specialist Group. 1996. *Crocodylus intermedius*. The IUCN Red List of Threatened Species 1996: e.T5661A11503444. http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.1996.RLTS.T5661A11503444.en.