

## CONTRIBUTED PAPERS

## Análisis de la Microbiota Bacteriana, Aislada en Heces de *Tapirus bairdii*, de la Sierra Madre de Chiapas, México

Güiris, A. D. M.<sup>1,3</sup>, Rojas, H. N. M.<sup>2</sup>, Berovides A. V.<sup>2</sup>, Cruz, A. E.<sup>4</sup>,  
Chávez, H. C.<sup>4</sup>, Moguel, A. J. A.<sup>4</sup>, Pérez, E. M. E.<sup>1,3</sup>, Pérez, E. R.<sup>1,3</sup>

- <sup>1</sup> Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de Chiapas. Cuerpo Académico Estudio Biomédicos en Fauna del Estado de Chiapas. Departamento de Ciencias Médico Veterinarias. E-mail: dmguiris@hotmail.com  
<sup>2</sup> Facultad de Biología. Coordinación de posgrado. Depto. Microbiología. Universidad de la Habana, Cuba.  
<sup>3</sup> Policlínica y Diagnóstico Veterinario, Laboratorio de diagnóstico clínico zoonosanitario.  
<sup>4</sup> Oficina de Investigación. Zoológico Regional "Miguel Álvarez del toro", Instituto de Historia natural y Ecología del Gobierno del Estado de Chiapas (IHNE).

### Abstract

**F**eces of 20 *Tapirus bairdii* were collected from two areas (La Sepultura and El Triunfo) in the Biosphere Reserve of the Sierra Madre de Chiapas, and examined with microbiological techniques (System API BioMeriux). In the tapir's samples we detected bacteria of the families Enterobacteriaceae, Aeromonadaceae, Micrococcaceae and others. We found *Aeromonas hydrophila*, *Alcaligenes sp.*, *Acinetobacter sp.*, *Citrobacter sp.*, *Citrobacter braakii*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter amnigenus*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxitoca*, *Klebsiella planticola*, *Klebsiella pneumoniae*, *Kluyvera sp.*, *Proteus mirabilis*, *Proteus penneri*, *Serratia marscencens*, *Serratia odorifera*, *Micrococcus sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Staphylococcus lentus*. These species constitute new records for Baird's tapir intestinal microbiota.

### Introducción

Se está efectuando un estudio formal para conocer los aspectos ecológicos, biológicos, biomédicos y de sanidad en *Tapirus bairdii*, lo que permite aportar conocimientos importantes para el diseño de una estrategia de conservación ex-situ en México. Esta información permitirá identificar la microbiota normal, los posibles agentes etiológicos potencialmente productores de enfermedades, sus efectos patogénicos y factores de riesgo epidemiológicos, con lo cual se podrá establecer e implementar medidas terapéuticas y/o de control y

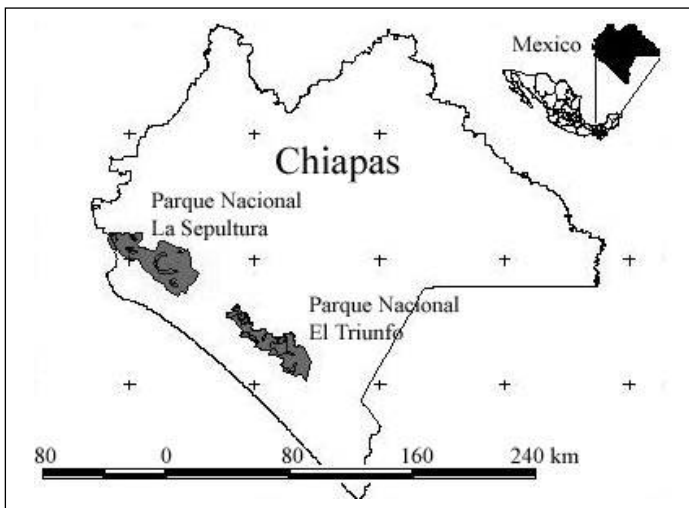
prevención de enfermedades, con especial énfasis en poblaciones silvestres y en cautiverio en el estado de Chiapas.

### Materiales y Métodos

El material estudiado proviene de 20 excretas recién defecadas de *Tapirus bairdii*, y recolectadas del suelo durante el seguimiento de los animales avistados. Las excretas que se toman en cuenta para este estudio presentan características muy particulares desde el olor, color, textura y además algo importante que hemos documentado es que los excrementos frescos de tapir en un tiempo promedio de tres horas son "atacados" por los escarabajos peloteros Coleoptera Scarabaeidae, por lo que podemos asegurarnos de el tiempo aproximado de haber sido excretados por los animales.

El trabajo se realizó en las zonas núcleo de las Reservas de la Biosfera "La Sepultura" (Polígono "La Palmita") y "El Triunfo" (Polígono I) ubicadas entre 16° 21' 56" y 16° 20' 18" de latitud norte, y 93° 58' 31" y 93° 53' 10" longitud oeste en la Sierra Madre de Chiapas; durante el periodo de 2002 al 2005 figura 1.

Las excretas recolectadas se transportaron y procesaron en un laboratorio móvil dentro de las Reservas de la Biosfera, implementado para desarrollar los procesos de siembra y primoaislamiento de bacterias, bajo las mayores condiciones de asepsia y bioseguridad (Güiris y Cruz, 2002). Los medios de cultivo empleados para el aislamiento bacteriano de la enterobacteria se seleccionaron de acuerdo a los criterios descritos por Konemam et al. (2001), Agar MacConkey, Agar Azul de Metileno Eosina, Agar Salmonella Shigella,



**Figura 1.** El trabajo se realizó en las zonas núcleo de las Reservas de la Biosfera “La Sepultura” y “El Triunfo”.

Agar Sangre, Caldo Verde Brillante (BD Bioxon). Los medios de cultivo se inocularon con un asa bacteriológica, dentro de un campo estéril, realizándose la siembra por medio de estrías de superficie en cada una de las placas. Estos fueron incubados a 37° Celsius en aerobiosis durante 24 a 72 hrs. Se seleccionaron colonias para verificar su taxonomía de acuerdo con lo descrito por Staley y Krieg (1984) para la caracterización morfológica colonial, propiedades tintoriales (Gram), morfología y agrupación bacteriana microscópica, pruebas de identificación taxonómica para la evaluación del metabolismo bacteriano mediante las reacciones de un sustrato bioquímico (sistema API 20 E, API Staph, API 20 NE) y de oxidación y fermentación de carbohidratos con las cepas aisladas (BioMerieux s/a; Macfaddin, 1990; Güiris 2003). La identificación bacteriana, dependiendo de las reacciones observadas en las pruebas bioquímicas (positivas o negativas), se basó en la identificación numérica del perfil observado de cada micropozo de los diferentes sustratos bioquímicos, apoyándose en el cálculo de su proximidad relativa a los distintos taxones de la base de datos (% id), así como a su proximidad al perfil más típico de cada taxón (índice T). Dichos cálculos fueron analizados a través del programa APILAB PLUS Versión 2007 (bioMérieux). El Método de cuantificación de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) empleado es el descrito por Seeley et al. (1991).

## Resultados

De acuerdo a los aislamientos bacterianos de coprocultivos en Tapir Centroamericano, denotaron una frecuencia y distribución proporcional de 262 (100%)

cepas aisladas. La proporción de aislamientos en Grupo bacteriano o Familias se distribuyó como sigue: Aeromonadaceae con la menor proporción de aislamientos 4.96%, Bacilos Gram Negativos No Fermentadores (BGNNF) con el 11.83%, Enterobacteriaceae con la mayor proporción de aislamientos 75.19% y Micrococcaceae con el 8.01%. Con respecto a la identificación de cepas bacterianas, se identificaron las siguientes especies: *Aeromonas hydrophila*, *Alcaligenes sp.*, *Acinetobacter sp.*, *Citrobacter sp.*, *Citrobacter braakii*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter amnigenus*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxitoca*, *Klebsiella planticola*, *Klebsiella pneumoniae*, *Kluyvera sp.*, *Proteus mirabilis*, *Proteus penneri*, *Serratia marscencens*, *Serratia odorifera*, *Micrococcus sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Staphylococcus lentus* (Tabla 1).

En cuanto a la cuantificación de bacterias por gramo de heces, se observó un promedio  $\pm$  desviación estándar (valor mínimo valor máximo) de  $7.900.000 \pm 1.6$  (6.300.000 – 9.600.000) Unidades Formadoras de colonias (UFC) en época de secas y  $86.000.000 \pm 4.0$  (82.000.000. – 90.000.000) UFC en época de lluvias.

## Discusion

Los aislamientos bacterianos de heces de *Tapirus bairdii* silvestre de las Reservas de la Biosfera en la Sierra Madre de Chiapas fue predominante para cepas bacterianas de la familia Enterobacteriaceae en comparación a las familias Aeromonadaceae, Micrococcaceae y el Grupo Bacteriano de BGNNF. Estos resultados concuerdan con Jawetz (1990), quien reporta que algunos autores mencionan ciertos tipos de bacterias de la familia Enterobacteriaceae, que llegan a ser habitantes normales de la flora intestinal, donde no producen generalmente enfermedades e incluso contribuyen a la función y la nutrición normal y que ciertos géneros llegan a volverse patógenos, solo cuando colonizan los tejidos que están fuera del tubo intestinal, en particular las vías urinarias y biliares, los pulmones, el peritoneo y las meninges, causando inflamación de estos sitios.

Nuestros aislamientos bacterianos en Tapir Centroamericano concuerdan con trabajos realizados por diferentes autores en el orden Perissodactyla: Göltenboth et al. (1996), reporta el aislamiento de *Escherichia coli* en el Tapir de la India (*Tapirus indicus*), el mismo autor reporta también el aislamiento de la misma bacteria en hígado, bazo, e intestino de Rinoceronte Negro (*Diceros bicornis*), los cuales se encuentran filogenéticamente relacionados con el Tapir y los Équidos. Güiris et al. (2001) aislaron *Escherichia coli* de intestino (ciego, colon y recto) de dos *Tapirus bairdii* con enterotoxemia del Zoológico Regional

**Tabla I. Distribución proporcional de la frecuencia de aislamientos bacterianos a partir de coprocultivos en Tapir Centroamericano de las Reservas de la Biosfera “El Triunfo” y “La Sepultura” en la Sierra Madre de Chiapas.**

Familia / Grupo	Bacteria	% Familia / Grupo	No. Cepas	%
Aeromonadaceae	<i>Aeromonas hydrophila</i>	4.96	13	4.96
BGNNF	<i>Alcaligenes</i> sp.	11.83	14	5.34
	<i>Acinetobacter</i> sp.		17	6.48
Enterobacteriaceae	<i>Citrobacter</i> sp.	75.19	3	1.14
	<i>Citrobacter braakii</i>		12	4.58
	<i>Citrobacter freundii</i>		13	4.96
	<i>Enterobacter aerogenes</i>		5	1.90
	<i>Enterobacter amnigenus</i>		5	1.90
	<i>Enterobacter cloacae</i>		4	1.52
	<i>Escherichia coli</i>		83	31.67
	<i>Klebsiella oxitoca</i>		10	3.81
	<i>Klebsiella planticola</i>		14	5.34
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		8	3.05
	<i>Kluyvera</i> sp.		10	3.81
	<i>Proteus mirabilis</i>		7	2.67
	<i>Proteus penneri</i>		5	1.90
	<i>Serratia marcencens</i>		7	2.67
<i>Serratia odorifera 1</i>	11	4.19		
Micrococcaceae	<i>Micrococcus</i> sp.	8.01	7	2.67
	<i>Staphylococcus</i> sp.		10	3.81
	<i>Staphylococcus lentus</i>		4	1.52
		100%	262	100.00

Miguel Álvarez del Toro, en Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. En un estudio de caso de Bronconeumonía en *Tapirus bairdii* del estado de Chiapas, al realizar aislamientos de vías respiratorias y digestivas, Güiris et al. (2002) reportan: *Enterococcus faecalis*, un estreptococo intestinal aislado en faringe, *Escherichia coli* y *Citrobacter freundii* aislado de intestino, lo que sugiere que una bacteria (*Enterococcus* sp.) de la microbiota intestinal de caballo o tapir puede actuar como un patógeno potencial en vías respiratorias. Por otra parte, Carter y Chengappa (1991) reportan aislamientos de *Escherichia coli* en Caballo. Pérez (2005) también encontró *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* y *Kluyvera* sp. en tapir, caballo y mula, aparentemente sanos. Esto sugiere que dichas bacterias forman parte de la microbiota residente del intestino de estos Perisodáctilos. Con respecto a *Alcaligenes* sp. y *Klebsiella planticola*, aislados en excretas de tapir, pueden estas bacterias estar supeditadas posiblemente a los hábitos alimentarios del tapir, dado que esta bacteria se encuentra en suelo o plantas (Koneman et al. 2001). La mayor frecuencia

de aislamientos bacterianos en Tapir fue para la especie *Escherichia coli* en un 31.67%. cifra que concuerda con lo encontrado por Güiris et al. 2001. que reportan un 57.0% de aislamientos de la especie en tracto digestivo de tapires en el Zoológico Miguel Álvarez del Toro en Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.

El grupo *Serratia liquefaciens* es clasificada no como una especie única, sino como una colección de muchos grupos de hibridación de DNA bacterianos, la cual se aísla del ambiente y de humanos (Koneman et al. 2001).

En la presente investigación se identificaron las siguientes especies: *Escherichia coli*, *Kluyvera* sp., grupo *Serratia liquefaciens*, *Citrobacter koseri*, *Pantoea agglomerans*, *Proteus vulgaris* y *Acinetobacter* sp. Dicho resultado con-

cuerda con lo descrito por Koneman et al. (2001) en donde cita que *Escherichia coli* es uno de los aislamientos bacterianos más comúnmente realizados en el laboratorio de muestras de tracto gastrointestinal. Por otra parte *Kluyvera* sp. es raramente identificada en muestras de heces de humanos (Koneman et al. 2001). En tanto que el aislamiento de *Pantoea agglomerans* concuerda con lo descrito por Koneman et al. (2001), en donde citan que esta especie bacteriana ha sido aislada de fuentes biofísicas diversas (plantas, animales, humanos, agua) y de heridas, sangre, orina y órganos internos. Mientras que *Proteus vulgaris*, se encuentra en aislamientos recuperados con más frecuencia de muestras clínicas y son distribuidos en la naturaleza en forma amplia, estos microorganismos se encuentran en el suelo y el agua, sobre las plantas y como lo indica el nombre de la familia, dentro del tracto intestinal de los seres humanos y animales. Es parte de la microbiota intestinal de mamíferos, y ha sido recuperado con mayor frecuencia en huéspedes inmunosuprimidos, en particular aquellos que han recibido tratamientos prolongados con antibióticos (Koneman

et al. 2001), lo cual concuerda con lo descrito por Jawets et al. (1990), quien también menciona que esta especie produce infecciones sólo cuando abandona el tubo intestinal. Referente a los aislamientos bacterianos de *Citrobacter koseri* realizados, Koneman et al. (2001) menciona que pueden encontrarse en orina, nariz, esputo y heridas, causa rara de meningitis y abscesos cerebrales en neonatos y han sido obtenidos predominantemente de materia fecal.

En cuanto al aislamiento de *Acinetobacter sp.* Koneman et al. (2001), reporta el aislamiento de esta especie bacteriana en infecciones de heridas de piel y nosocomiales, neumonías, peritonitis, y bacteriemias en humanos. La frecuencia de aislamientos bacterianos en heces fueron altos en *Tapirus bairdii*, lo cual puede ser debido al hábito alimentario (dieta variada y rica en fibra de tallos y hojas) que quizás no sea muy fermentable. Esto difiere de lo descrito por Hojberg et al. (2003) en un estudio sobre la capacidad catabólica microbiana gastrointestinal de cerdos con dietas fermentables líquidas o fibrosas secas, quienes observaron una disminución de la población microbiana (microbiota residente) probablemente por el efecto bactericida del ácido láctico y bajo pH.

## Literatura citada

- BioMerieux. Programa APILAB PLUS: (Versión 2007). Francia.
- BioMerieux s/a. Sistema de Identificación bacteriana. Diagnostico "in vitro" BioMerieux, S.A. Francia, 2000.
- Carter G.R., Chengappa M.M. 1991. Bacteriología y Micología Veterinarias, aspectos esenciales. 2ª. edición. Edit. El Manual Moderno, S.A. de C. V. México. D.F.
- Gólttenboth R., Busch W., Jenschke J., Oces Á. and Wittstatt U. 1996. Herpesvirus infection in an Indian Tapir (*Tapirus indicus*) and in a Black Rhinoceros (*Diceros bicornis*): Case Reports. Proceedings American Association of Zoo Veterinarians. Puerto Vallarta, México. 18-21.
- Güiris A.D.M., Samayoa O.Y.Y., Cruz A.E. and Lira T.I. 2001. Identification of Aerobic Bacteria from Internal Organs of *Tapirus bairdii* form Miguel Álvarez del Toro, Regional Zoo, Chiapas, México. First International Tapir Symposium. IUCN Species Survival Commission (SSC), Tapir Specialist Group. American Zoo and Aquarium Association (AZA), Tapir Taxon Advisory Group (TTAG), Tapir Preservation Fund (TPF). Noviembre. San José, Costa Rica. 3-8 (32).
- Güiris A.D.M., Rojas H.N.M., Bastard G.C.W., Pérez E.M.E. y Cruz A.E. 2002. Análisis Bacteriológico de una Bronconeumonía en *Tapirus bairdii* del estado de Chiapas, México. XVIII Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias (PANVET). Sesión Microbiología e Inmunología (poster). Palacio de las Convenciones, 18 - 22 de Noviembre. La Habana, Cuba.
- Güiris A.D.M., Cruz, A. E. 2002. Procedimientos de Bioseguridad en Proyectos de Investigación de Reservas de la Biosfera. Policlínica y Diagnóstico Veterinario, Instituto de Historia Natural y Ecología (ZooMAT) Gobierno del Estado de Chiapas (IHNE), Universidad Autónoma de Chiapas, Investigación y Posgrado. Tuxtla Gutiérrez Chiapas. P 39.
- Güiris A.D.M., Cruz A.E. 2003. Estudios Biomédicos y de Sanidad en *Tapirus bairdii* del Estado de Chiapas, México. En: Estudios Biomédicos y de Sanidad en Fauna Silvestre Nativa y Cautiva del Estado de Chiapas. Proyecto de Investigación continúa desde 1988... a la fecha. Policlínica y Diagnóstico Veterinario, Instituto de Historia Natural y Ecología (ZooMAT) Gobierno del Estado de Chiapas (IHNE), Universidad Autónoma de Chiapas, Investigación y Posgrado. Tuxtla Gutiérrez Chiapas. P 80.
- Hojberg O., Canibe N., Knudsen B. and Jensen B. B. 2003. Potential rates of fermentation in digesta from the gastrointestinal tract of pigs; Effect of feeding fermented liquid feed. Applied and Environmental Microbiology. January. 69(1): 408-418.
- INE-SEMARNAP. 1999a. Programa de manejo de la Reserva de la Biosfera "El Triunfo", México. Instituto Nacional de Ecología - Secretaría de Medio Ambiente Recursos Naturales y Pesca. México, D.F.
- INE-SEMARNAP. 1999b. Programa de manejo Reserva de la Biosfera "La Sepultura", Chiapas, México. Instituto Nacional de Ecología - Secretaría de Medio Ambiente Recursos Naturales y Pesca. México, D.F.
- Jawest E., Melnick L.J., Adelberg A.E., Brooks F.G., Butel S.J., Ornston N.L. 1990. Bastoncillos intestinales Gram negativos. En: Microbiología Médica, Capítulo 16, 13ª Edición México D.F. Editorial El Manual Moderno S.A. de CV. 204-214.
- Koneman E.W., Allen S.D., Janda W.M., Schreckenberger P.C., Winn W.C. 2001. Enterobacteriaceae. En: Diagnóstico Microbiológico Texto y atlas a color. Capítulo 4. 5a ed. Editorial Médica Panamericana S.A.: México D.F. 172-250.
- Macfaddin J.F. 1990. Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica. Editorial Panamericana, S.A. de C.V. México. D.F.
- PEOT. 2004. Programa de Ordenamiento Territorial del Estado de Chiapas. Gobierno del Estado. Chiapas, México.
- Pérez E.R. 2005. Identificación de la microbiota bacteriana en coprocultivos de *Tapirus bairdii* y equinos domésticos en la Sierra Madre de Chiapas, México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Chiapas.
- Seeley, H.W., Van Demark, P.J. and Lee, J.J. 1991. Microbes in action. A laboratory manual of microbiology. Fourth edition. W.H. Freeman and Company. USA.
- Staley J.T., Krieg N.R. 1984. Classification of prokaryotic organism: An overview. In Krieg N.R., Holt J.G. editors: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams and Wilkins. Baltimore, USA. Vol. 1: 1-4.