

# Universidad de Guadalajara

---

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia



Determinación Bacteriológica de los Principales Agentes  
que Influyen en la Mortalidad Embrionaria en el Huevo  
de Tortuga Golfina ( *Lepidochelys Olivacea* )

Tesis Profesional

Que para obtener el Título de:

Médico Veterinario Zootecnista

Presenta:

Mario Alberto Ayala Cortés

Guadalajara, Jalisco, 1991.



OFICINA DE  
DIFUSIÓN CIENTÍFICA

Fe de erratas.		
Dice	Debe decir	Pag.
gravemente.23	gravemente (23)	4
	determinante en la	7
microbiológica	bacteriológica	11
(Cuadros 2 y 8)	(Cuadros 1, 2, 7 y 8)	17

2703

## DEDICATORIA

A mi madre:

Gabina

Que gracias a su paciencia y apoyo  
logre la realización de esta tesis.

A mi hermano:

Ernesto

Que ha sabido ser un verdadero  
hermano.

A mis abuelos:

Julian

y

Juventina

Que han sido mis segundos padres.

## AGRADECIMIENTO

- A mi asesor el M. en C. Luis Villa, que gracias a sus atinados comentarios y observaciones además de su paciencia, se logro la realización de está tesis.
- Al Dr. Rodolfo Barba, por haberme motivado a la realización de éste tema.
- A la Q.F.B. Cristina Moran, quien mostro una gran paciencia en mi reaprendizaje en el laboratorio de Bacteriología.
- A la M. en C. Minerva Soto, por sus atinados comentarios.
- Al M. en C. Alfredo Ortega, por las enseñansas recibidas.
- Al Programa de Conservación de Tortuga Marina de la Universidad de Guadalajara, por el interes mostrado en la realización de éste tema, a pesar de todas las dudas.
- A mis compañeros, auxiliares del Programa de Tortuga Marina, por la ayuda prestada en las etapas de muestreo.
- Al M.V.Z. Gustavo Corona, a quien debo el que en mi haya nacido el interes por la titulación.
- A la XXVIII Generación de Medicos Veterinarios, en especial al grupo "B" con quienes pase gratos momentos.
- Al grupo de estudiantes de Medicina Veterinaria, interesados en el estudio de la Fauna Silvestre, que en todo momento mostraron interes en los avances de esta tesis.

## INDICE

Resumen .....	1
Antecedentes .....	3
Planteamiento del problema .....	7
Justificacion .....	8
Hipotesis .....	9
Objetivos .....	10
Material y metodos .....	11
Resultados.....	16
Discusion .....	19
Conclusiones .....	24
Cuadros .....	26
Bibliografra .....	35

Las tortugas marinas acuden año con año a la playa del "Playón de Mismaloya", Jalisco, a ovipositar durante los meses de Junio a Octubre.

En los últimos años el número de huevos de tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*) eclosionados ha descendido a pesar de que los colectados para su protección han aumentado.

Uno de los factores a estudiar es la contaminación microbiológica del huevo, la cual puede ocurrir durante su formación o su incubación.

El objetivo de ésta tesis fué aislar y cuantificar las bacterias presentes en el huevo durante la incubación, y la susceptibilidad de las mismas a los antibioticos.

Se colectaron 50 huevos recién ovipositados, 40 huevos incubados en playa y no eclosionados, dos muestras de arena de nidos naturales y seminaturales y una muestra de ovario y oviducto de una hembra ovígera, siendo colectadas en dos temporadas de anidación, 1988 y 1989.

En el laboratorio se analizaron e identificaron las bacterias presentes en ovario, oviducto, superficie de huevo, vitelo, embrión y arena de nido natural y seminatural, conforme a la técnica de Gentry. En el muestreo de la temporada 1988 se identificaron siete géneros, 12 especies y dos subespecies bacterianas, en la temporada 1989 se identificaron nueve géneros, 17 especies y dos subespecies bacterianas, encontrándose una mayor susceptibilidad a la combinación antibiótica Trimetoprim - Sulfametoxazol.

En éste trabajo se discute sobre el habitat natural de las bacterias identificadas y la suceptibilidad de las mismas a 12 antibióticos.

Se encontraron indicios de una activa incorporación bacteriana a la superficie del huevo, cuando éste ha sido depositado en la arená por la tortuga.

**ANTECEDENTES**

La tortuga marina, la cual pertenece al orden de los quelonios, se caracteriza por estar protegida por una coraza, carecer de dientes y tener una boca provista de un pico córneo. El caparazón de las tortugas o coraza esta formada por una parte ósea, la parte superior de la cual esta cubierta con placas córneas que varían de forma y de características en las diferentes especies, pero en todas ellas tienen una curiosa e interesante arquitectura (20, 23, 25).

Las tortugas marinas regresan año tras año a la misma playa para poner sus huevos. La formación de los nidos se lleva a cabo en las playas durante la noche. Las hembras cavan un hoyo con sus aletas posteriores y ovipositan en él, para que sean incubados al calor del sol, para lo cual son necesarios períodos de 40 a 70 días, dependiendo esto de la especie de tortuga marina de la cual se trate. Después de cubrir y disfrazar el nido removiendo la arena, las hembras regresan al mar dejando que la progenie se valga de sus propios recursos una vez que nacen (20, 23, 28).

La madurez sexual de algunas especies de tortuga marina ocurre en promedio entre los siete y 15 años de edad, tal es el caso de la tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*) (20, 29).

Los ovarios de la tortuga marina producen huevos cargados de vitelo. Los oviductos se abren anteriormente en la cavidad peritoneal mediante ostios bastantes grandes. A medida que los huevos de las tortugas descienden por el oviducto, las glándulas de las paredes segregan albúmina alrededor de los mismos. En el extremo posterior del oviducto, las glándulas de la cáscara segregan una substancia gomosa que forma una cáscara blanda pero resistente. Los huevos son fecundados internamente en el extremo superior del oviducto antes de que dichas substancias sean

añadidas alrededor de los mismos (3, 21, 27, 33).

La tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*) desova en todas las playas de la costa de Jalisco durante los meses de junio a octubre, la oviposición es nocturna y cada hembra puede depositar de dos a tres nidos por temporada con un promedio de 100 huevos por nido. La característica más dramática de su ciclo de vida, a diferencia de las demás, es la anidación sincronizada de cientos de miles de hembras, fenómeno conocido como arribada y su congregación frente a las playas de anidación facilita su captura, por lo que las poblaciones que anidaban en el Playón de Mismaloya han sido materialmente exterminadas (20, 29, 30).

En Jalisco, cuyas playas fueron de gran importancia para la reproducción de estos quelonios, llegaron a anidar hasta 25,000 individuos en un solo día en el Playón de Mismaloya. En la actualidad solo se puede contar con poblaciones de 1000 ejemplares en una temporada completa en esta misma localidad (29, 31)

Durante toda su vida, las tortugas están expuestas a peligros tanto naturales como creados por el hombre. Por una parte, una gran variedad de depredadores se alimentan de ellas y por otra, la gran cantidad de contaminantes que existen tanto en el medio terrestre como el marino las afectan gravemente.<sup>23</sup> Estos dos factores, unidos al más importante, que es la explotación del recurso por el hombre (carne y huevos que son utilizados en la alimentación, y de sus pieles, con las que se confeccionan distintos artículos de lujo), contribuyen al escandaloso decremento de las poblaciones de este apreciado animal (13, 22, 23, 29).

**REPORTE DE ANOMALIAS**

**CUCBA**

**A LA TESIS:**

**LCUCBA01444**

**Autor:**

**Ayala Cortes Mario Alberto**

**Tipo de Anomalía:**

**Errores de Origen: Faltan Folios No. 5  
Errores de Origen: Folio Duplicado No. 7**

A principio de los años 60s se establecieron campamentos con el fin de proteger a las tortugas marinas en Tehuamixtle y Cruz de Loreto, atendidos por pescadores de la zona de donde habia gran densidad de arribos. A partir de este año los decretos que se han establecido para declarar la veda total en la captura de tortuga marina han sido numerosos, sin embargo en ninguno de ellos se han obtenido los resultados deseados (29).

En 1982 por primera vez interviene la Universidad de Guadalajara a través de los estudiantes de la Facultad de ciencias, trabajando coordinadamente con la Delegación Federal de Pesca (29, 31).

A partir de este año la Universidad de Guadalajara ha participado en las tareas de campo a través de los estudiantes de la Facultad de Ciencias y conforme a los datos obtenidos de ésta y de la Secretaría de Pesca, en los últimos seis años que se ha trabajado en la colecta y siembra del huevo de tortuga, el porcentaje de crías eclosionadas en comparación del huevo colectado a comenzado a descender alarmantemente (Cuadro 1) por lo que se ha tomado en cuenta al factor microbiológico como posible causa de este descenso marcado (8, 23, 29, 30, 31).

Año	Nidos colectados	Huevo colectado	Crías liberadas	% de eclosión
1982	600	60,000	40,000	66.66
1983	295	29,000	18,000	62.06
1984	85	8,000	5,500	68.75
1985	700	70,000	45,000	64.28
1986	503	47,904	27,905	58.25
1987	1,044	97,855	39,844	40.71
1988	252	22,810	17,337	76.00
1989	398	44,364	30,173	68.01
1990	876	85,761	39,152	45.65

Cuadro 1: Conforme a los datos obtenidos de la Universidad de Guadaluajara y la Secretaría de Pesca el porcentaje de eclosión a partir de 1985 a 1987 a descendido en un 23.57%.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En los últimos años el porcentaje de huevo eclosionado de tortuga marina se ha reducido alarmantemente en un 23%, ya que en 1985 era de 64.28% y en 1987 se registro un 40.71% (29, 31). Los principales factores a los que se les puede atribuir esta baja, son: la salinidad (8), la estación, los aspectos fisiológicos en el intercambio de gases (1, 4, 5, 6, 7, 18, 35), parasitismo (23) y contaminación bacteriana(8), éste último es al que se le considera como causante de la mortalidad embrionaria en sus diferentes etapas de desarrollo y como factor disminución de las eclosiones.

**JUSTIFICACION**

A pesar de contar con un programa de protección hacia la tortuga marina, su población ha menguado en grado extremo en los últimos años y aunado a esto, se ha registrado una alta mortalidad embrionaria, por lo consiguiente un marcado descenso en la eclosión del huevo, aún cuando la colecta de éste ha aumentado. Debido a la falta de información precisa con respecto a los diversos factores que pueden afectar las diferentes etapas embrionarias del huevo, se ha reflexionado sobre el factor microbiológico como una causa de la mortalidad embrionaria. Este estudio busca en primer plano, delimitar el universo bacteriológico del huevo de la tortuga marina y fundamentar sus propias bases para las etapas subsiguientes de dicho estudio.

**HIPOTESIS**

Durante los últimos años el número de huevos de tortuga marina eclosionados ha ido en descenso a pesar de que el número de huevos incubados ha aumentado, por lo tanto, la contaminación bacteriana del huevo es un factor determinante en la mortalidad embrionaria, al incorporarse a su interior durante su formación, ya sea en el ovario o en el oviducto y podría ser considerada como infección de origen congénito, o bien incorporarse al huevo a través del cascarón después de que éste fué puesto en un sitio contaminado, propiciado por un mal manejo en su colección y traslado a los corrales de incubación.

## OBJETIVOS

## OBJETIVOS GENERALES

1. Determinar la presencia de bacterias en el huevo de tortuga marina, como factor determinante en la mortalidad embrionaria.

## OBJETIVOS PARTICULARES

1. Identificar la microbiota bacteriana presente en el huevo y organos reproductores de la tortuga marina.
  - 1.1. Identificar la microbiota bacteriana presente en ovario, oviducto, cascaron y embrión.
2. Correlacionar los datos obtenidos sobre la microbiota bacteriana presente en la tortuga con la encontrada en los embriones muertos.
  - 2.1. Identificar la microbiota bacteriana presente en el nido natural, nido semiartificial, huevo recién ovipositado y el que ha estado en contacto con la arena, y huevo eclosionado y no eclosionado.
3. Comparar las poblaciones bacterianas encontradas en ambos objetivos.

MATERIAL Y METODOS

La colecta de muestras se realizó en el campamento tortuguero El Playón de Mismaloya, municipio de Tomatlán, Jalisco, localizado a 29° 59' 45" Latitud Norte y 104° 59' 48" Longitud Oeste, siendo dividido en dos fases:

1.- Muestreo piloto o de ensayo.

2.- Verificación de la incidencia microbiológica del muestreo piloto.

De las fases mencionadas, cada una fue la continuación de la otra y las mismas se realizaron en periodos de anidación diferente (un año cada una, dos en total).

#### 1.- FASE DEL MUESTREO PILOTO O DE ENSAYO:

Esta se realizó con la finalidad de delimitar lo más posible el universo microbiológico del huevo, y obtener un fundamento para las pruebas de laboratorio de la siguiente fase. Esta etapa se subdividió en otras tres, las cuales son las siguientes:

- a) Obtención de órganos reproductores de una hembra ovígera.
- b) Obtención de huevo, inmediatamente después de ser ovipositado.
- c) Obtención de muestras de huevo no eclosionado (embriones muertos).

#### OBTENCION DE HUEVO, INMEDIATAMENTE DESPUES DE SER OVIPOSITADO:

Se realizaron dos muestreos de huevo, siendo colectados 10 huevos

por muestreo (12, 14, 32), los cuales se colectaron de dos diferentes maneras: cinco huevos al momento de salir de la cloaca y cinco una vez que la tortuga había tapado el nido, para de esta forma determinar el momento de mayor incorporación bacteriana a la superficie del huevo. Las muestras fueron colectadas en bolsas de polietileno, previamente esterilizadas con luz ultravioleta (34), una vez tomadas se mantuvieron en refrigeración para su posterior traslado al laboratorio en un tiempo no máximo de 48 horas. Los nidos de donde se colectaron las muestras fueron trasladados al corral de incubación (28), para posteriormente tomar de estos las muestras de huevo no eclosionado.

#### OBTENCION DE MUESTRAS DE HUEVO NO ECLOSIONADO (EMBRIONES MUERTOS):

Una vez transcurrido el periodo de incubación el cual es de 45 días para la tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*) (28), se realizaron dos muestreos, de donde se colectaron 10 huevos por cada uno de ellos, colocándolos en bolsa estéril de polietileno y manteniéndolos en refrigeración para su posterior traslado al laboratorio en un tiempo no mayor de 48 horas.

#### OBTENCION DE ORGANOS REPRODUCTORES DE UNA HEMBRA OVIGERA:

Se colectó una muestra de ovario y oviducto la cual fué obtenida durante una disección en fresco de una hembra ovígera, para de esta forma poder determinar si existe incorporación bacteriana durante la formación del huevo (24), una vez colectada se mantuvo en refrigeración para su posterior traslado al laboratorio, en un tiempo no mayor de 48 horas.

## 2.- VERIFICACION DE LA INCIDENCIA BACTERIOLOGICA DEL MUESTREO

## PILOTO:

Esta fase fué la continuación de la anterior, verificándose la incidencia bacteriana del primer muestreo, además de determinar la susceptibilidad bacteriana a 12 diferentes antimicrobianos. Al igual que la fase anterior esta fué subdividida, pero, presentó algunas variantes ya que en lugar de obtener una muestra de órganos reproductores, se obtuvieron muestras de arena de nidos naturales y seminaturales, y del vitelo de huevo recién ovipositado.

- a) Obtención de huevo, inmediatamente después de ser ovipositado.
- b) Obtención de muestras de arena de nidos naturales y seminaturales.
- c) Obtención de muestras del vitelo de huevo recién ovipositado.
- d) Obtención de muestras de huevo no eclosionado.

## OBTENCION DE HUEVO, INMEDIATAMENTE DESPUES DE SER OVIPOSITADO:

Con base en los resultados obtenidos en la cuantificación bacteriana de la fase anterior, se optó por incrementar a tres el número de muestreos realizados de huevo recién ovipositado, cada uno se hizo por separado y en diferente fecha, tratando de cubrir los tres meses de mayor anidación en playa. En cuanto a la colecta del huevo, se siguió el mismo procedimiento que en el muestreo piloto.

OBTENCION DE MUESTRAS DE ARENA DE NIDOS NATURALES Y SEMINATURALES: 14

Este muestreo fue realizado durante la colecta del huevo recién ovipositado, y se obtuvieron de la siguiente manera: Una vez que la tortuga terminó de escavar el nido, se procedió a tomar una muestra de arena, de la máxima profundidad del mismo, la cual se realizó con un guante estéril, siendo colocada posteriormente en una bolsa de polietileno estéril, este mismo procedimiento fue utilizado con el nido seminatural en el corral de incubación; las muestras fueron mantenidas en refrigeración para su posterior traslado al laboratorio.

OBTENCION DE MUESTRAS DEL VITELLO DE HUEVO RECIEN OVIPOSITADO:

Las muestras se obtuvieron en el laboratorio, al abrir el huevo del muestreo de huevo recién ovipositado y extraer el vitelo, para de éste tomar las muestras con un hisopo estéril (14).

OBTENCION DE MUESTRAS DE HUEVO RECIEN OVIPOSITADO (EMBRIONES MUERTOS):

Para la toma de muestras de huevo no eclosionado se utilizó el mismo procedimiento que en el muestreo piloto.

MEDIOS DE CULTIVO:

La cuantificación bacteriana solo se realizó en el huevo recién ovipositado y en las muestras de arena, para lo cual se utilizó el medio de agar soya tripticasa.

El aislamiento de las colonias de ovario, oviducto, huevo recién

ovipositado, arena, vitelo y huevo no eclosionado se realizo por el método de estría, en cajas con agar Mc Conkey, agar S - 110 y agar gelosa sangre, éste ultimo estaba compuesto de medio básico de agar gelosa sangre y 5 % de sangre de borrego, estos medios fueron incubados a 37° C durante 48 horas.

Con los cultivos asi obtenidos se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas: Morfología según la tinción de gram, oxidación fermentación (O.F.), movilidad, formación de oxidasa, catalasa, indol, ácido sulfhídrico, descarboxilación de la lisina, ornitina, licuefacción de la gelatina, actividad de la ureasa y crecimiento en agar Mc Conkey (9, 19).

#### FORMACION DE ACIDO A PARTIR DE CARBOHIDRATOS:

Para realizar esta prueba se preparó medio de agar base rojo de fenol, al que se le agregó el carbohidrato a utilizar; glucosa, lactosa, maltosa, manitol, sacarosa, xilosa y salicin, en una concentración al 1 %. De cada medio se vaciaron 2 ml en un tubo de ensaye. Una vez inoculado el medio, se incubó a 37° C durante 24 horas. En los carbohidratos en los que se formó ácido, se observó una coloración amarilla, en caso contrario el color permanecía sin cambiar.

#### ANTIBIOGRAMAS:

A las colonias bacterianas identificadas se les realizaron antibiogramas, en los cuales se utilizó el agar de Mueller Hinton y se emplearon multidiscos con 12 antibacterianos (10). La técnica utilizada fue la prueba de Kirby Bauer (15).

## RESULTADOS

Para la primera fase, correspondiente a la temporada 1988, se realizaron dos muestreos de huevo recién ovipositado, dos de huevo incubado en playa y no eclosionado y uno de ovario y oviducto.

De los dos muestreos de huevo recién ovipositado, se cuantificó e identificó las colonias bacterianas. Para la cuantificación el huevo fue dividido en dos grupos (Cuadros 1 y 2):

- a) Huevo al momento de salir de la cloaca.
- b) Huevo colectado una vez que la tortuga había cubierto el nido.

En el primer muestreo de huevo se aislaron 33 colonias bacterianas, de las cuales solo se obtuvo como dato, el que eran bacilos gram (-)

En el segundo muestreo de huevo se aislaron 25 colonias bacterianas, de las cuales 24 eran bacilos gram (-) y un coco gram (+). Se identificaron seis géneros y siete especies bacterianas (Cuadro 3).

De los dos muestreos de huevo incubado en playa en condiciones seminaturales y no eclosionado, se aislaron 48 colonias bacterianas, de las cuales 47 eran bacilos gram (-) y un coco gram (+), se identificaron siete géneros y diez especies (Cuadros 4 y 5).

En el muestreo de ovario y oviducto de una hembra ovígera, se aislaron tres colonias bacterianas, de las cuales uno era bacilo gram (-) y dos cocos gram (+), de donde se identificaron dos géneros y dos especies (Cuadro 4).

Para la segunda fase del muestreo, correspondiente a la temporada 1989, se realizaron tres muestreos de huevo recién ovipositado, dos muestreos de arena de nidos naturales y seminaturales, dos muestreos al vitelo del huevo recién ovipositado y dos de huevo incubado en playa y no eclosionado.

En los tres muestreos de huevo recién ovipositado se procedió a cuantificar las colonias bacterianas presentes en la superficie del huevo (Cuadros 7 y 8) y solo se identificaron las colonias bacterianas de los dos últimos muestreo. Para su cuantificación el huevo se dividió de la misma forma que para la primera fase.

Para comparar los datos obtenidos en la cuantificación bacteriana de ambas fases, se realizó la prueba estadística de chi-cuadrado ( $\chi^2$ ), en donde el huevo colectado al momento de salir de la cloaca es igual a la frecuencia observada, y el huevo colectado una vez que la tortuga había cubierto el nido es igual a la frecuencia esperada: el valor de chi-cuadrado fue de 4.1399 con 19 grados de libertad (Cuadros 2 y 8).

De los dos muestreos de huevo recién ovipositado en los que se procedió a identificar, se aislaron 44 colonias bacterianas, de las cuales 39 eran bacilos gram (-) y cinco gram (+), se identificaron nueve géneros, 14 especies y dos subespecies (Cuadro 12). A éste mismo huevo se le procedió a aislar las bacterias presentes en vitelo, se aislaron seis colonias bacterianas las cuales eran bacilos gram (-), se identificaron dos géneros, dos especies y dos subespecies (Cuadro 13).

En los dos muestreos de arena de nidos naturales y seminaturales, se cuantificó e identificó las colonias bacterianas por gramo de

arena. Se aislaron tres colonias bacterianas, las cuales eran bacilos gram (-), se identificaron dos géneros, tres especies y una subespecie (Cuadros 9, 10 y 11).

De los muestreos de huevo incubado en playa en condiciones seminaturales y no eclosionado se aislaron 38 colonias bacterianas, las cuales eran bacilos gram (-). Se identificaron cuatro géneros y siete especies bacterianas (Cuadro 14 y 15).

Los datos obtenidos de las pruebas de antibiograma, se observan en el Cuadro 17.

Los porcentajes de incidencia de los géneros y especies bacterianos encontrados en los muestreos de la primera fase fueron: *Pseudomonas aeruginosa* 28.37 %, *Aeromonas caviae* 16.21 %, *Alcaligenes faecalis* 12.16 %, *Aeromonas salmonicida* 10.81 %, *Pseudomonas fluorescens* 9.45 %, *Pseudomonas putrefaciens* 8.10 %, *Acinetobacter calcoaceticus anitratus* 2.70 %, *Acinetobacter calcoaceticus lwoffii* 2.70 %, *Achromobacter xylooxidans* 2.70 %, *Staphylococcus aureus* 2.70 %, *Achromobacter* *sp.* 1.35 %, *Providencia alcalifaciens* 1.35 %, *Staphylococcus xylosus* 1.35 %.

Muestreos de la segunda fase: *Acinetobacter calcoaceticus lwoffii* 14.77 %, *Pseudomonas aeruginosa* 12.50 %, *Aeromonas salmonicida* 11.36 %, *Pseudomonas fluorescens* 9.09 %, *Pseudomonas putrefaciens* 7.95 %, *Proteus mirabilis* 7.95 %, *Aeromonas caviae* 6.80 %, *Proteus vulgaris* 6.80 %, *Acinetobacter calcoaceticus anitratus* 5.68 %, *Alcaligenes faecalis* 4.50 %, *Escherichia coli* 3.40 %, *Staphylococcus capitis* 2.27 %, *Proteus penneri* 1.13 %, *Klebsiella rhinoscleromatis* 1.13 %, *Staphylococcus aureus* 1.13 %, *Staphylococcus auricularis* 1.13 %, *Staphylococcus xylosus* 1.13 %.

(Cuadros 6 y 16).

## DISCUSSION

Algo que se debe de aclarar antes de dar inicio a la discusión, es el hecho de que éste trabajo es único, no existiendo trabajos semejantes.

Para la primera fase de los muestreos que eran dos, la diferencia de valores obtenidos sugirió que el tamaño de la muestra fue insuficiente, y debido a esto, se incrementó a tres el número de muestreos para la segunda fase, en donde el número de U.F.C./cm<sup>2</sup> se continuó incrementando en los huevos extraídos una vez que la tortuga había tapado el nido.

La tortuga golfina (*Leidochelys olivacea*), al emerger del mar y buscar un lugar adecuado para depositar sus huevos, tiene que reptar por la arena, y al hacerlo recoge bacterias con la cloaca a través de la cual habra de pasar el huevo, que será contaminado con las bacterias ahí presentes.

Respecto a la diferencia de bacterias por gramo de arena nos sugiere un considerable incremento de U.F.C./gr de arena en los nidos naturales que en los seminaturales.

Cuando la tortuga escava el nido, vierte gran cantidad de arena de la superficie de la playa al interior de éste, con lo que se acarrear bacterias, que posteriormente habrán de entrar en contacto con el huevo, cosa que no ocurre de la misma forma en los nidos seminaturales, ya que el vertido de la arena superficial es mínimo.

La activa incorporación bacteriana a la superficie del huevo, puede considerarse como un factor no determinante de la mortalidad embrionaria de la tortuga golfina (*Lepidochelys*

*olivacea*), debido a que en cuatro de los cinco nidos muestreados, el huevo que fue incubado presentó porcentajes de eclosión de 89.13 % hasta 100.00 %, encontrándose un nido que presentó un promedio de 7.35 U.F.C./cm<sup>2</sup> en huevo colectado al momento de salir de la cloaca, y 1,644.72 U.F.C./cm<sup>2</sup> en huevo colectado una vez que la tortuga había cubierto el nido, el cual presentó un 100.00 % de eclosión; y otro nido con un promedio de 789,728.08 U.F.C./cm<sup>2</sup> en el huevo colectado al momento de salir de la cloaca, y 2'458,181.60 U.F.C./cm<sup>2</sup> en huevo colectado una vez que el nido había sido cubierto, presentando una eclosión del 96 %.

De los resultados obtenidos de la prueba estadística de chi-cuadrado ( $\chi^2$ ), al ser comparados en la tabla de valores de chi-cuadrado, se deduce que los resultados no son significativos, lo que hace evaluar al factor microbiológico como un elemento más, de un conjunto de factores que actúan en el huevo y entre ellos habría que mencionar la infertilidad, la herencia, la fisiología del huevo, el medio ambiente, el manejo, entre otros.

Durante la primera fase del muestreo se identificaron un total de siete géneros, 12 especies y dos subespecies de bacterias en huevo, embriones, ovario y oviducto; en la segunda fase se identificaron nueve géneros, 17 especies y dos subespecies bacterianas en huevo, arena, vitelo y embriones.

En la primera fase, las bacterias que aparecen con más frecuencia en huevo son: *Aeromonas caviae*, *Aeromonas salmonicida* y *Pseudomonas aeruginosa*. En embriones: *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* y *Alcaligenes faecalis*. En órganos reproductores de la hembra ovífera son: *Aeromonas caviae* en

ovario y *Staphylococcus xylosus* en oviducto. Para la segunda fase las bacterias que aparecen con más frecuencia en huevo son: *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas caviae* y *Acinetobacter calcoaceticus Ihoffi*. En vitelo: *Acinetobacter calcoaceticus Ihoffi*, *Aeromonas caviae* y *Acinetobacter calcoaceticus anitratus*. En vitelo de embriones no eclosionados: *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa* y *proteus mirabilis*.

Las bacterias encontradas en embriones se pueden dividir en dos grupos:

a) Las bacterias presentes desde el huevo: *Aeromonas caviae*, *Aeromonas salmonicida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Alcaligenes faecalis* y *Acinetobacter calcoaceticus* con sus dos subespecies *anitratus* y *Ihoffi*.

b) Las bacterias que se incorporan durante la incubación: *Pseudomonas fluorescens*, *Providencia alcalifaciens* y *Pseudomonas putrefaciens*, para la primera fase, y para la segunda son las siguientes.

a) Las bacterias presentes desde el huevo: *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putrefaciens*, *Acinetobacter calcoaceticus Ihoffi* y *Alcaligenes faecalis*.

b) Las bacterias que se incorporan durante la incubación: *Pseudomonas fluorescens*, *Proteus mirabilis* y *Proteus vulgaris*.

Con respecto a la incidencia bacteriana, el mayor porcentaje corresponde a: *Pseudomonas aeruginosa* y *Aeromonas caviae* en los muestreos de la primera fase, y *Acinetobacter calcoaceticus Ihoffi* y *Pseudomonas aeruginosa* para la segunda fase de muestreos, pero, las únicas bacterias presentes en todos y cada

uno de ellos son: *Aeromonas caviae* en la primera y *Acinetobacter calcoaceticus lwoffii* y *Aeromonas caviae* en la segunda, por lo tanto y con base en lo anterior, se considera al género, *Aeromonas* y *Acinetobacter* como de alto interés, aun más que aquellas que presentan una mayor incidencia.

Por otra parte es interesante hacer notar el gran número de géneros y especies bacterianos aislados desde la formación del huevo hasta la eclosión del mismo, y al hacer una evaluación global, no existe algún género o especie predominante para ambas fases, lo que hace dudar de la acción microbiológica como un factor determinante en la mortalidad embrionaria de la tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*), lo cual podría deberse a un sistema biológico del mismo huevo.

El género *Pseudomonas* se encuentra en suelos y aguas servidas, estancadas, de mar, pozos, lagos y rios presentando una amplia distribución geográfica (19), además ha sido reportado en tortugas marinas (16, 17) y terrestres (36).

El género *Aeromonas* tiene una distribución cosmopolita en la sal natural, agua estancada y circulante (19), y ha sido aislado de juveniles de *Chelonia mydas* (16, 36).

El género *Acinetobacter* esta ampliamente distribuido en la naturaleza, encontrándose en suelos y aguas servidas (19).

El género *Alcaligenes* se encuentra en suelos y aguas, presentando una amplia distribución geográfica, además ha sido aislado en tortugas terrestres (36).

Al género *Achromobacter* no se le conoce un habitat natural, pero, ha sido reportado en clínicas y hospitales, principalmente en agua y soluciones (19).

Los microorganismos de la familia *Enterobacteriaceae* son comunes en el tracto intestinal del ser humano y los animales, pero eventualmente han sido aisladas en juveniles de *Chelonia mydas* (16) y tortugas terrestres (36).

Las bacterias del género *Staphylococcus* son comunes en los mamíferos, por lo que su aparición en las muestras sugiere una posible contaminación debido al manejo de las mismas. De acuerdo con esto se descarta su análisis en todas las muestras.

En las pruebas de antibiograma realizadas con 12 antimicrobianos a las 14 especies bacterianas identificadas, durante la segunda fase, solo uno resultó ser efectivo en más de un 90 %.

El único antimicrobiano efectivo en contra de las especies bacterianas identificadas, es la combinación Trimetoprim - Sulfametoxazol.

## CONCLUSIONES

Se encontraron indicios de una activa incorporación bacteriana a la superficie del huevo cuando éste ha sido depositado en la arena por la tortuga.

La cloaca es considerada como un foco de contaminación bacteriana para el huevo.

Existe un incremento de U.F.C./gr de arena en los nidos naturales que en los seminaturales.

La concentración bacteriana en la superficie del huevo no es significativa estadísticamente, por lo que no se puede considerar como un factor determinante en la mortalidad embrionaria.

Existen dos especies bacterianas que se aislaron en todos los muestreos y son: *Aeromonas caviae* y *Acinetobacter calcoaceticus* *lwoffii*.

Las bacterias que presentaron una mayor incidencia, fueron tres especies y por orden de importancia son: *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter calcoaceticus* *lwoffii* y *Aeromonas caviae*.

De las bacterias identificadas, los géneros *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Acinetobacter* y *Alcaligenes* se les puede considerar como naturales del medio en el que fueron aisladas, debido a su amplia distribución geográfica.

Las bacterias pertenecientes a la familia de las *Enterobacteriaceae* pueden considerarse como ocasionales, debido a que, donde fueron aisladas no es su habitat natural.

De las pruebas de antibiograma realizadas solo dos antimicrobianos actúan sobre las bacterias identificadas.

Los antimicrobianos utilizados en las pruebas de antibiograma, dos presentan actividad en contra de las bacterias identificadas, y son: la combinación Trimetoprim - Sulfametoxazol y la Carbenicilina.

CUADROS

Número de bacterias por  $\text{cm}^2$  de superficie en los huevos colectados al momento de salir de la cloaca.

1 <sup>er</sup> Muestreo	2 <sup>do</sup> Muestreo
0.25	5,649.35
25.00	285.71
4.54	7'475,324.60
6.62	4,298.70
0.38	2,077.92
$X = 7.35 \text{ U.F.C./cm}^2$	$X = 1'497,527.25 \text{ U.F.C./cm}^2$
100.00 % de eclosión	89.13 % de eclosión

CUADRO No. 2

Número de bacterias por  $\text{cm}^2$  de superficie en los huevos colectados una vez que la tortuga había cubierto el nido.

1 <sup>er</sup> Muestreo	2 <sup>do</sup> Muestreo
77.92	11'968,831.00
7,792.20	2'140,259.70
272.72	13,597.40
2.85	62,337.66
77.92	14'961,038.00
$X = 1,644.72 \text{ U.F.C./cm}^2$	$X = 5'829,212.75 \text{ U.F.C./cm}^2$
100.00 % de eclosión	89.13 % de eclosión

$$\chi^2 = 4.1399$$

Con 19 grados de libertad

Géneros y especies bacterianos identificados de la superficie del huevo recién ovipositado, durante el segundo muestreo.

GENERO	ESPECIE	No. DE COLONIAS
Aeromonas	caviae	7
Aeromonas	salmonicida	5
Pseudomonas	aeruginosa	5
Achromobacter	xylooxidans	2
Acinetobacter	calcoaceticus anitratus	2
Alcaligenes	faecalis	1
Achromobacter	vd	1
Staphylococcus	aureus	1

CUADRO No. 4

Géneros y especies bacterianos identificados en embriones de huevo no eclosionado, ovario y oviducto.

GENERO	ESPECIE	No. DE COLONIAS
Embrione:		
Pseudomonas	aeruginosa	16
Pseudomonas	fluorescens	7
Pseudomonas	putrefaciens	6
Alcaligenes	faecalis	8
Aeromonas	caviae	4
Aeromonas	salmonicida	2
Acinetobacter	calcoaceticus lwoffii	2
Providencia	alcalifaciens	1
Staphylococcus	aureus	1
Ovario:		
Aeromonas	caviae	1
Oviducto:		
Staphylococcus	xylosus	1

## CUADRO No. 5

Géneros y especies bacterianos que se incorporan al huevo durante el proceso de incubación.

GENERO	ESPECIE
Pseudomonas	fluorescens
Pseudomonas	putrefaciens
Acinetobacter	calcoaceticus lwoffii
Providencia	alcalifaciens

## CUADRO No. 6

Porcentaje de incidencia de los géneros y especies bacterianos identificados durante la primera fase de muestreos, temporada 1988.

GENERO	ESPECIE	% DE INCIDENCIA
Pseudomonas	aeruginosa	28.37
Aeromonas	caviae	16.21
Alcaligenes	faecalis	12.16
Aeromonas	salmonicida	10.81
Pseudomonas	fluorescens	9.45
Pseudomonas	putrefaciens	8.10
Acinetobacter	calcoaceticus anitratus	2.70
Acinetobacter	calcoaceticus lwoffii	2.70
Achromobacter	xylosoxidans	2.70
Staphylococcus	aureus	2.70
Achromobacter	vd	1.35
Providencia	alcalifaciens	1.35
Staphylococcus	xylosus	1.35

## CUADRO No. 7

Número de bacterias por  $\text{cm}^2$  de superficie en el huevo colectado al momento de salir de la cloaca.

1 <sup>er</sup> . Muestreo	2 <sup>do</sup> . Muestreo	3 <sup>er</sup> . Muestreo
1,038.96	555,844.15	77.92
597.40	21.16	2.07
779.22	4,311.68	0.64
19.61	3'387,012.99	116.88
11.55	1,441.55	1,363.63

96.00 % de eclosión

$$X = 789,728.08 \text{ U.F.C./cm}^2$$

$$X = 489.34 \text{ U.F.C./cm}^2$$

$$X = 312.22 \text{ U.F.C./cm}^2$$

100.00 % de eclosión

## CUADRO No. 8

Número de bacterias por  $\text{cm}^2$  de superficie en el huevo colectado una vez que la tortuga había cubierto el nido.

1 <sup>er</sup> . Muestreo	2 <sup>do</sup> . Muestreo	3 <sup>er</sup> . Muestreo
332,467.53	332,467.53	128,571.42
467,532.46	8'976,623.38	190,909.09
285.71	72,727.27	418,181.81
1,753.24	1'412,987.01	1'059,740.26
118,181.81	1'496,103.90	2,701.29

96.00 % de eclosión

$$X = 2'458,181.60 \text{ U.F.C./cm}^2$$

$$X = 184,044.15 \text{ U.F.C./cm}^2$$

$$X = 360,020.74 \text{ U.F.C./cm}^2$$

100.00 % de eclosión

$$X^2 = 4.1399$$

Con 19 grados de libertad

## CUADRO No. 9

Número de bacterias por gramo de arena, colectada del fondo de dos nidos naturales.

1 <sup>er</sup> - Muestreo	1'440,000.00 U.F.C./gr
2 <sup>do</sup> - Muestreo	36'966,400.00 U.F.C./gr

## CUADRO No. 10

Número de bacterias por gramo de arena, colectada del fondo de dos nidos seminaturales.

1 <sup>er</sup> - Muestreo	330.00 U.F.C./gr
2 <sup>do</sup> - Muestreo	0.00 U.F.C./gr

## CUADRO No. 11

Géneros y especies bacterianos identificados en las muestras de arena de nidos naturales y seminaturales.

GENERO	ESPECIE	No. DE COLONIAS
1 <sup>er</sup> Muestreo, nido natural		
Acinetobacter	calcoaceticu lwoffii	1
Nido seminatural		
Pseudomonas	aeruginosa	1
2 <sup>do</sup> Muestreo, nido natural		
Pseudomonas	fluorescens	1

Nido seminatural

No se aislaron colonias bacterianas, en la muestra tomada

CUADRO No. 12

Géneros y especies bacterianos identificados de la superficie del huevo recién ovipositado.

GENERO	ESPECIE	No. DE COLONIAS
Aeromonas	salmonicida	10
Aeromonas	caviae	4
Acinetobacter	calcoaceticus lwoffii	7
Acinetobacter	calcoaceticus anitratus	4
Pseudomonas	aeruginosa	4
Pseudomonas	putrefaciens	2
Alcaligenes	faecalis	2
Achromobacter	xylooxidans	1
Escherichia	coli	3
Proteus	penneri	1
Klebsiella	rhinoscleromatis	1
Staphylococcus	capitis	2
Staphylococcus	aureus	1
Staphylococcus	xylosus	1
Staphylococcus	auricularis	1

CUADRO No. 13

Géneros y especies bacterianos identificados de embriones de vitelo del huevo recién ovipositado.

GENERO	ESPECIE	No. DE COLONIAS
Acinetobacter	calcoaceticus lwoffii	3
Acinetobacter	calcoaceticus anitratus	1
Aeromonas	caviae	2

Géneros y especies bacterianos identificados en embriones de huevo no eclosionado.

GENERO	ESPECIE	No. DE COLONIAS
Pseudomonas	aeruginosa	7
Pseudomonas	fluorescens	8
Pseudomonas	putrefaciens	5
Proteus	mirabilis	7
Proteus	vulgaris	6
Acinetobacter	calcoaceticus Iwoffi	3
Alcaligenes	faecalis	2

CUADRO No. 15

Géneros y especies bacterianos que se incorporan al huevo durante el proceso de incubación.

GENERO	ESPECIE
Pseudomonas	fluorescens
Proteus	mirabilis
Proteus	vulgaris

## CUADRO No. 16

Porcentaje de incidencia de géneros y especies bacterianos identificados durante la segunda fase de muestreos, temporada 1989.

GENERO	ESPECIE	% DE INCIDENCIA
Acinetobacter	calcoaceticus lwoffy	14.77
Pseudomonas	aeruginosa	12.50
Aeromonas	salmonicida	11.36
Pseudomonas	fluorescens	9.09
Pseudomonas	putrefaciens	7.95
Proteus	mirabilis	7.95
Aeromonas	caviae	6.80
Proteus	vulgaris	6.80
Acinetobacter	calcoaceticus anitratus	5.68
Alcaaligenes	faecalis	4.50
Escherichia	coli	3.40
Staphylococcus	capitis	2.27
Achromobacter	xylooxidans	1.13
Proteus	penneri	1.13
Klebsiella	rhinoscleromatis	1.13
Staphylococcus	aureus	1.13
Staphylococcus	auricularis	1.13
Staphylococcus	xylosus	1.13

CUADRO No. 17

Porcentajes de susceptibilidad bacteriana a 12 diferentes antibacterianos.

Género y especie	Cef.	S-T	Cefox.	Amp.	Mit.	Carb.	Amit.	Gent.	Clor.	Ac.Wa.	Tetra.	Estrep.	No.
<i>Ps. aeruginosa</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	62.5	12.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	8
<i>Ps. Fluorescens</i>	0.0	14.2	14.2	0.0	0.0	85.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	7
<i>Ps. putrefaciens</i>	42.8	100.0	42.8	57.1	0.0	57.1	0.0	28.5	0.0	14.2	0.0	0.0	7
<i>A. salmonicida</i>	0.0	83.3	0.0	16.6	0.0	16.6	0.0	0.0	50.0	0.0	16.6	16.6	6
<i>A. caviae</i>	0.0	66.6	33.3	0.0	33.3	0.0	33.3	0.0	33.3	0.0	0.0	0.0	3
<i>A. c. lwoffii</i>	25.0	62.5	0.0	25.0	0.0	37.5	25.0	50.0	0.0	12.5	0.0	0.0	8
<i>A. c. anitratus</i>	25.0	75.0	0.0	0.0	0.0	25.0	0.0	0.0	50.0	0.0	0.0	0.0	4
<i>A. Paecalis</i>	0.0	50.0	50.0	0.0	0.0	50.0	0.0	0.0	0.0	50.0	0.0	0.0	2
<i>A. xylosoxidans</i>	0.0	100.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.0	0.0	100.0	100.0	1
<i>Proteus mirabilis</i>	50.0	100.0	16.6	50.0	0.0	66.6	0.0	16.6	16.6	0.0	0.0	0.0	6
<i>P. vulgaris</i>	25.0	100.0	75.0	25.0	0.0	75.0	25.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4
<i>P. penneri</i>	0.0	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1
<i>E. coli</i>	100.0	100.0	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3
<i>K. rhinoscleromatis</i>	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.0	0.0	0.0	1

## B I B L I O G R A F I A .

- 1.- ACKERMAN, R. A. (1988) "Physiological an ecological aspects of gas exchange by sea turtle eggs"., Physiological Research Laboratory Scripp, Institution of Oceanography p. 575 - 583
- 2.- ANON (1986) "Es adecuado su huevo incubable," Rev. Sintesis avicola, Vol. 4 No. 1 p. 27 - 29
- 3.- ASHLEY, L. M. (1974) "Laboratory anatomy of the turtle", WM. C. Brown Company Publisher, First edition, p. 27 - 29
- 4.- ACUÑA, R. (1984) "La ultraestructura superficial de la cascara del huevo de la tortuga marina *Lepidochelys olivacea* Eschscholtz", Rev. BRENESIA 22:299 - 308 Costa Rica.
- 5.- ACUÑA, R. (1989) "Anatomía microscópica de la cascara del huevo de la tortuga Carey *Eretmochelys imbricata* (Linnaeus, 1766)", Rev. BRENESIA 31:33 - 41 Costa Rica.
- 6.- BRAKE, J. T. (1986) "Incubabilidad una mirada diferente", Rev. Industria avicola, Vol. 33 No. 11 p. 4 - 8
- 7.- BUSTARD, H. R. (1971) "Temperature and water tolerances of incubating sea turtle eggs", British Journal of Herpetology 4:96 - 98 Australia.
- 8.- CRASTZ, F. (1982) "Embriological stages of the marine turtle (*Lepidochelys olivacea*), Rev. Biol. Trop. 30 (2) 113 - 120 Panama.

- 9.- COWAN, S. T., K. J. Steel (1982) "Manual para la identificación de bacterias de importancia médica", Cia. Editorial Continental S. A., Segunda edición p. 77 - 175 México.
- 10.- CAMACHO V., E., G. Santies, M. T. Perusquia (1987) "Comparación de cuatro compuestos utilizados en la desinfección de huevo fertil", Memorias de la XII convención anual de la asociación nacional de especialistas en ciencias avícolas de México, Ixtapa Zihuatanejo, México., p. 163 - 166
- 11.- DAWES, C. J. (1986) "Botanica marina" Editorial Limusa, Primera edición, p. 631 - 651 México.
- 12.- ELLIS, E. M. (1977) "Metodos de cultivo para la investigación de Salmonelosis y Arizonosis animales", Editorial acribia, p.p. 98 España.
- 13.- FRAZIER, J. (1986) "Sobre la conservación de tortugas marinas en México, II Encuentro inter-universitario sobre tortugas marinas en las costas del Pacifico Mexicano, Rev. Ciencia Universitaria 3 y 4, p. 6 - 9 México.
- 14.- GENTRY, R. F. (1980) "Manejo e higiene del huevo para incubar", Rev. Avirama, Vol. II, No. 14 p. 22 - 27 México.
- 15.- GIDD, S., J. T. Hernandez (1983) "Manual de bacteriología médica", Escuela nacional de ciencias biológicas, 4 ed. p. 225 - 234 México.

- 16.- GLAZEBROOK, J.; R. S. F. Cambell (1990), "A survey of the diseases of marine turtle in northern Auastralia. I. Farmed turtles", Rev. Diseases of aquatic organisms 9:83 - 95 Australia.
- 17.- GLAZEBROOK, J.; R. S. F. Cambell (1990), "A survey of the diseases of marine turtles in northern Australia. II. Oceanarium-reared and wild turtles", Rev. Diseases of aquatic organisms 9:97 - 104 Australia.
- 18.- JONES, R. (1986) "Manejo e incubación de huevos fértiles", Rev. Sintesis avicola, Vol. 4, No. 4, p. 6 - 10 México.
- 19.- LENNETTE, E. H. (1987) "Manual de microbiología clínica, Editorial médica Panamericana, 4 ed. p. 189 - 592 México.
- 20.- MARQUEZ M., R., A. Villanueva O., C. Peñaflores S. (1976) "Sinopsis de datos biológicos sobre la tortuga golfina, *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz, 1829) en México", I.N.P. Sinop. Pesca, (2):61 p México.
- 21.- MONTAGNA, W. (1979) "Antomía comparada", Editorial Omega, 5 ed., p. 279 - 283 México.
- 22.- MORAN A., R. E. (1986) "Porque y para que conservamos (tortugas marinas)", Rev. Ciencia universitaria 3 y 4 p. 10 - 13 México.
- 23.- MADRID, J., A. Olea, R. Ortiz (1985) "Preservación de la tortuga marina", Rev. Ciencia universitaria 2 p. 20 - 25 México.

- 24.- NORTH, M. O. (1982) "Manual de producción avícola", Editorial el manual moderno, 2 ed., p. 95 - 101 México.
- 25.- ORTEGA O., A. T., G. Bartlett (1987) "Estudio acerca de la biología de la tortuga Laud (*Dermochelys coriacea*) en la playa de "El Farito" Edo. de Michoacán, México", Inedito.
- 26.- PALLERONI, N. J. (1983) "The taxonomy of bacteria", Rev. Bio Science, Vol. 33 No. 6 p. 370 - 377.
- 27.- ROMER, A. S., T. S. Parsons (1981) "Anatomía comparada", Editorial Interamericana, 3 ed. p. 53 - 60 México.
- 28.- SALIN P., D. A., A. Adame R. (1987) "Manual para el manejo de campamentos tortugueros", SEDUE, 74 p México.
- 29.- SEPESCA (1988) "La protección de la tortuga marina en el Estado de Jalisco", Conferencia dada ante la asociación de ingenieros ecologistas.
- 30.- SEPESCA (1986) "Departamento de acuicultura, tortugas marinas, decreto, generalidades, especies de Jalisco", No. 2
- 31.- SILVA B., F., J. Arciniega, J. Mariscal, F. A. Velazco, E. Godínez, E. Parra, B. Palma (1986) "Participación de la Universidad de Guadalajara en la conservación de la tortuga marina en Jalisco (1982 - 1985)", Rev. Tiempo de ciencias, No. 2 p. 13 - 16 México.

- 32.- TIJERINA, G. (1985) Control bacteriológico y microbiológico de una planta incubadora", Rev. Sintesis avicola, Vol. 3, No. 11 p. 13 - 16 México.
- 33.- WEICHERT, Ch. K., W. Presch (1981) "Elementos de anatomía de los cordados", Editorial Mc Graw - Hill, 3 ed. en Español, p. 297 - 314
- 34.- WHEATON, F. W. (1982) "Acuacultura diseño y construcción de sistemas", AGT. Editor S. A., Primera edición, p. 601 - 637 México.
- 35.- WHITMORE, C. P., P. H. Dutton (1985) "Infertility, embryonic mortality and nest - site selection in Leatherback and green sea turtles in Suriname", Rev. Biological conservation, 34: 251 - 272
- 36.- YVES, J. L. (1983), "Les cheloniens: Entretien et pathologie", These pour le Doctorat Veterinaire, Universite Paul Sabatier de Toulouse, Francia.