

***Pseudomonas* sp. EN AVES MIGRATORIAS Y RESIDENTES (CHARADRIIFORMES) EN EL ESTADO SUCRE, VENEZUELA**

***Pseudomonas* sp. IN MIGRATORY AND RESIDENT BIRDS (CHARADRIIFORMES) OF THE BOCARIPO-CHACOPATA LAGOON COMPLEX, SUCRE STATE, VENEZUELA**

JESSICA RODRÍGUEZ¹, PEDRO LÓPEZ², JORGE MUÑOZ³, NILYAN RODRÍGUEZ², JOSÉ FUENTES

¹Postgrado en Biología Aplicada, Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, Cumaná, Sucre, Venezuela.

²Centro Regional de Investigaciones Ambientales, Universidad de Oriente, Núcleo Nueva Esparta, Venezuela

³Centro de Investigaciones Ecológicas Guayacán, Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, Venezuela
e-mail: jnrmar@gmail.com

RESUMEN

Describir la flora bacteriana de animales aparentemente sanos es un paso esencial para entender la epidemiología de las enfermedades que pueden afectar a poblaciones naturales. En el caso de aves, la interpretación de esta información se complica con un factor adicional representado por las numerosas especies de aves migratorias que pueden cubrir extensas áreas geográficas. Conocer la existencia de microorganismos con potencial zoonótico entre animales silvestres tiene además un significado importante en la salud pública. Las aves se capturarán mediante redes de niebla, el cultivo, aislamiento e identificación se realizará usando técnicas microbiológicas de uso común en el laboratorio. Se analizaron 40 muestras de heces provenientes de 5 especies de aves del orden Charadriiformes, 4 migratorias: *Tringa melanoleuca* (n=6), *Tringa flavipes* (n=6), *Actitis macularia* (n=6), *Calidris pusilla* (n=6) y una residente: *Charadrius wilsonia* (n=16). Se procedió a identificar presencia de Bacilos Gram negativos con reacción positiva a la prueba de la oxidasa y preclasificados como no fermentadores de la glucosa sobre la base de metabolismo en agar TSI. Se aislaron 161 cepas, de las cuales el 31% (n=50) pertenecen a la familia Pseudomonadaceae, se identificaron: *Pseudomonas aeruginosa* con una prevalencia del 72% (n = 36) y *Pseudomonas fluorescens* con 28% (n = 14). Se demuestra la importancia de la identificación de estos microorganismos ya que han establecido un reservorio en este grupo de aves, las cuales pueden servir a la vez como agentes de dispersión de enfermedades.

PALABRAS CLAVE: Charadriiformes, bacilos Gram negativos, *Pseudomonas* sp.

ABSTRACT

The description of bacterial flora of seemingly healthy animals is an essential step to understand the epidemiology of the illnesses that can affect natural populations. In the case of birds, the interpretation of this information is complex with the additional factor of numerous migratory species that can include extensive geographical areas. The presence of microorganisms with zoonotic potential among wild animals has an important meaning for public health. Birds were captured using fog-nets; the cultivation, isolation and identification of bacteria were carried out using microbiological techniques of common use in the laboratory. Forty fecal samples obtained from 5 bird species from the order Charadriiformes, 4 migratory: *Tringa melanoleuca* (n=6), *Tringa flavipes* (n=6), *Actitis macularia* (n=6), *Calidris pusilla* (n=6) and one resident: *Charadrius wilsonia* (n=16). The bacteria were classified according to the Gram staining technique, shape oxidase test and glucose metabolism in TSI agar. A total of 161 strains were isolated, of which 31% (n=50) belong to the family Pseudomonadaceae. Two species were identified: *Pseudomonas aeruginosa* with a prevalence of 72% (n = 36) and *Pseudomonas fluorescens* with 28% (n = 14). The importance of the identification of these microorganisms is demonstrated since this group of birds constitutes a reservoir of these bacteria which can cause infection in humans, serving, at the same time, as dispersion agents of disease.

KEY WORDS: Charadriiformes, Gram negative rods, *Pseudomonas* sp.

INTRODUCCIÓN

Conocer la existencia de microorganismos con potencial zoonótico entre animales silvestres tiene un significado importante en la salud pública (Thomas *et al.*, 2001). Existen factores que apoyan la hipótesis de que las aves migratorias pueden ser las responsables de

introducir y de difundir microorganismos patógenos entre diferentes continentes. Ellas son consideradas hospederos introductorios, pues presumiblemente transportan el microorganismo hasta nuevos vectores y hospederos a lugares separados por miles de kilómetros de distancia (Rappole y Hubálek, 2003). Una variedad de bacterias patógenas pueden ser transportadas asintóticamente

por animales, incluyendo aves silvestres, entre ellas se encuentran: *Salmonella* sp., *Helicobacter* sp. (Waldeström *et al.*, 2003), *Mycobacterium* sp. (Bono *et al.*, 2005), *Yersinia* sp. (Niskanen *et al.*, 2003), *Listeria* sp. (Quessy y Messier 1992), *Mycoplasma* sp. (Hartup *et al.*, 2001), *Campylobacter jejuni* (Petersen *et al.*, 2001), *Escherichia coli* (Holland *et al.*, 1996), *Vibrio* sp. (Brittingham *et al.*, 1988; Ogg *et al.*, 1989) y *Pseudomonas* sp. (Brittingham *et al.*, 1988).

Existe evidencia que las zoonosis causadas por bacilos Gram negativos están distribuidas alrededor del mundo y han sido aislados de una gran variedad de orígenes ecológicos; ellos se encuentran frecuentemente en heces de la fauna silvestre y afecta a un gran número de animales, incluyendo aves silvestres y cautivas (Brittingham *et al.*, 1986). Entre las aves de vida libre afectadas se encuentran: paserinos (Maurer *et al.*, 1998), psitacinos, gallináceas (Dodson *et al.*, 1999), aves acuáticas (Palmgren *et al.*, 1994) y rapaces (Battisti *et al.*, 1998).

Las aves de vida silvestre han sido implicadas como reservorios naturales del grupo de los vertebrados de varios patógenos entéricos de humanos incluyendo *Campylobacter* sp. (Altekruse *et al.*, 1999), *Escherichia coli* (Waldenström *et al.*, 2002) y *Salmonella* sp. (Palgreen *et al.*, 2004). Ellas son frecuentemente mencionadas como posibles vectores para la transmisión de estas bacterias hasta los animales domésticos y humanos (Dobbin *et al.*, 2005).

Ya que las aves silvestres migran y son susceptibles a infecciones pueden funcionar como diseminadoras efectivas de enfermedades a través de la contaminación fecal de pastos y superficies de agua, lo cual está bien documentado en la literatura científica, sobre todo en aguas que no tienen fuentes directas o notables de contaminación. Debido a este hecho pueden existir distintos modos de transmisión de estos microorganismos al ser humano: a) Contagio por contacto directo con estas fuentes de agua, b) Consumo de productos marinos contaminados y c) A través de aves de corral y de hospederos mamíferos que se encuentran en las proximidades de la zona donde se localizan las aves migratorias que se usaron para esta investigación. Estos factores facilitan la propagación de los microorganismos patógenos hasta el hombre. En nuestro país y específicamente en el estado Sucre no existe un estudio que sirva de base para describir la presencia de bacterias en las aves. Las lagunas costeras son un rasgo fisiográfico importante de la Península de Araya y son consideradas como uno de los ecosistemas de mayor relevancia por sus funciones ecológicas (criaderos de peces, protección de costas, hábitat de

numerosas especies de aves) donde se desarrollan diferentes actividades impulsadas por su productividad pesquera, atractivo escénico y biodiversidad. Debido a los múltiples usos de este entorno y a que una gran variedad de microorganismos son eliminados periódicamente a través de las heces de las aves, para los cuales la salinidad no es un factor limitante para su multiplicación, lo cual representa un riesgo latente de contaminación para las aguas de este complejo lagunar así como para la fauna acuática que forma parte de este hábitat marino (peces, crustáceos, moluscos) y por ende para la población aledaña a este ecosistema. Por estas razones se hace necesario detectar la presencia de *Pseudomonas* sp. en heces provenientes de aves del orden Charadriiformes para determinar la presencia de este microorganismo como parte de su flora intestinal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se recolectaron 40 muestras de heces de aves del orden Charadriiformes. Se clasificaron de la siguiente manera: 6 muestras de *Tringa melanoleuca*, 6 muestras de *Tringa flavipes*, 6 muestras de *Actitis macularia*, 6 muestras de *Calidris pusilla* (migratorias) y 18 muestras de *Charadrius Wilsonia* (residente). El área de muestreo se localiza en el complejo lagunar Bocaripo-Chacopata (10° 40' N y 63° 48' W), ubicada al noroeste de la Península de Araya (Figura 1). Los muestreos se realizaron con una frecuencia mensual, desde enero hasta abril de 2006. Las muestras fueron colocadas en colectores de heces y luego en bolsas plásticas de cierre hermético, se trasladaron en cava de anime con hielo al laboratorio de Microbiología del Centro regional de investigaciones ambientales, estado Nueva Esparta. Para el estudio bacteriológico las muestras se procesaron inmediatamente después de su arribo.

Análisis bacteriológicos

Para el aislamiento las muestras fueron sembradas en agar Mac Conkey (Difco) y agar nutritivo, se incubaron de 18 a 24 horas a 37°C. Al ser obtenidas las cepas puras fueron repicadas en placas con agar nutritivo para llevar a cabo la oxidasa (Mac Faddin 1990). Adicionalmente se les realizó la coloración de Gram y se sembraron en agar hierro triple azúcar, para efectuar una preclasificación de las mismas.

Familia pseudomonadaceae

Para la identificación de microorganismos pertenecientes al género *Pseudomonas* se tomaron en cuenta el crecimiento de colonias sospechosas en agar

Mac Conkey, resultados de la oxidasa y el metabolismo de las cepas en el agar TSI. Adicionalmente se llevaron a cabo pruebas bioquímicas, basadas en las técnicas descritas por Mac Faddin, 1990: crecimiento en agar sangre a 42 °C, color del pigmento, fluorescencia, motilidad (caldo tripticasa soya), crecimiento en NaCl al 6%, descarboxilación de aminoácidos, utilización de carbohidratos en medio oxidación fermentación con y sin parafina (glucosa, manitol, maltosa, fructosa, sacarosa, xilosa), hidrólisis de gelatina al 4%. Los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas diferenciales se compararon con los aportados en la clave de identificación descrita por Murray *et al.*, 2002.

RESULTADOS

En el curso de la investigación se analizaron un total de 40 muestras de aves migratorias (Charadriiformes) lográndose aislar un total de 161 cepas: 31% (n=50) pertenecientes a la familia Pseudomonadaceae (oxidasa positiva y TSI Alc/Alc).

Del 31% (n=50) pertenecientes a la familia Pseudomonadaceae se identificaron: *Pseudomonas aeruginosa* 72% (n = 36) y *Pseudomonas fluorescens* 28% (n = 14).

Charadrius wilsonia

Se analizaron 16 muestras, de las cuales se aislaron 15 cepas pertenecientes a la familia Pseudomonadaceae: 87% (n=14) corresponden a *Pseudomonas aeruginosa* y 13% (n=2) a *Pseudomonas fluorescens*, no se encontraron ambas especies en las muestras analizadas (Figura 2).

Tringa melanoleuca

Se analizaron 6 muestras, de las cuales se aislaron 12 cepas pertenecientes a la familia Pseudomonadaceae, en el 100% (n=6) de las muestras se identificaron tanto *Pseudomonas aeruginosa* como *Pseudomonas fluorescens* (Figura 2).

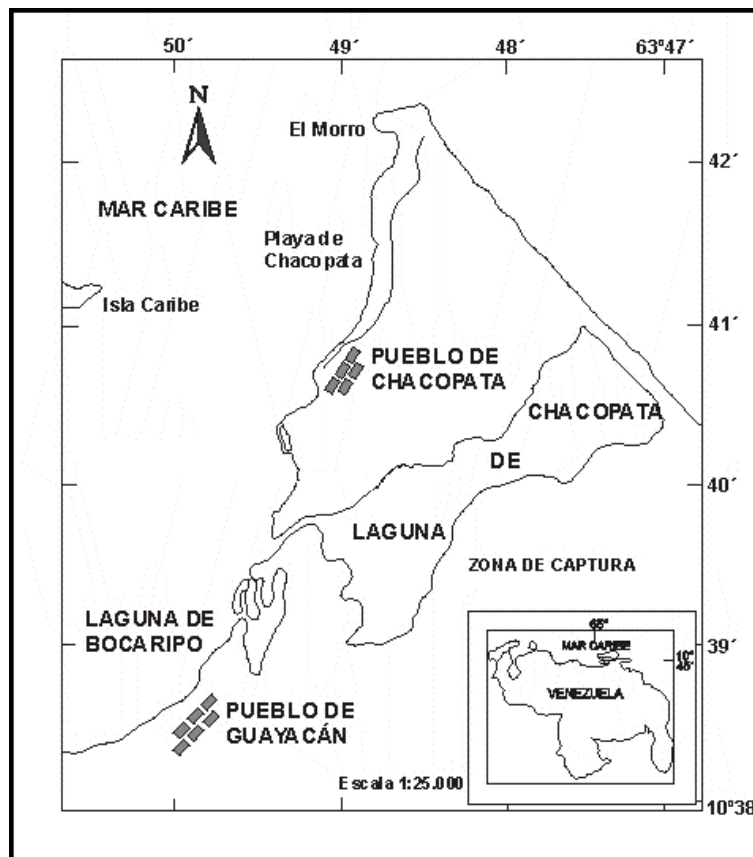


Figura 1. Zona de estudio.

Tringa flavipes

Se analizaron 6 muestras, de las cuales se aislaron 8 cepas pertenecientes a la familia Pseudomonadaceae: 50% (n=3) *Pseudomonas aeruginosa*, 17% (n=1) *Pseudomonas fluorescens* y en el 33% (n=2) de las muestras estudiadas se identificaron ambas especies (Figura 2).

Calidris pusilla

Se analizaron 6 muestras y se aislaron 7 cepas pertenecientes a la familia Pseudomonadaceae: 66% (n=4) *Pseudomonas aeruginosa*, 17% (n=1) *Pseudomonas fluorescens* y se encontraron ambas especies en el 17% (n=1) de las muestras analizadas (Figura 2).

Actitis macularia

Se analizaron 6 muestras de las cuales se aislaron 6 cepas pertenecientes a la familia Pseudomonadaceae: 83% (n=5) *Pseudomonas aeruginosa* y 17% *Pseudomonas fluorescens* (n=1), no se aislaron ambas especies de una misma muestra (Figura 2).

DISCUSIÓN

La flora intestinal de aves silvestres no está bien documentada, particularmente lo relacionado con la familia Pseudomonadaceae y en especies del orden Charadriiformes. En la mayoría de los casos la información sobre la prevalencia de bacterias en aves silvestres proviene de aves muertas, las cuales son examinadas y se reporta el patógeno causante de la misma, esto señala la

causa de la mortalidad más no indica la frecuencia real de un microorganismo en la población de aves (Brittingham *et al.*, 1998). Las investigaciones realizadas se enfocan en bacterias enteropatógenas tales como *Salmonella* (Samuel *et al.*, 2004); *Escherichia coli* (La Ragione *et al.*, 2002) y *Campylobacter* (Lévesque *et al.*, 2000) en grupos de aves distintos al orden Charadriiformes. Sin embargo, se considera de importancia la identificación de las diferentes bacterias que forman parte de la flora intestinal presentes en las heces de este grupo de aves, debido a que aparecen como sus hospederos y al mismo tiempo como vectores; tanto de microorganismos considerados patógenos entéricos como de microorganismos que pueden causar distintas afecciones en los seres humanos. Tal es el caso de miembros de la familia Pseudomonadaceae, la cual presentó una prevalencia muy elevada en este grupo de aves debido a que en todas las muestras de heces provenientes de las cinco especies de aves, se detectó la presencia de *P. aeruginosa* y de *P. fluorescens*. En investigaciones previas ha sido reportada la presencia de esta familia bacteriana, sin embargo no se ha establecido que especies en particular se han detectado. Bowman y Jacobson (1980) aislaron *Pseudomonas* sp. del 5% de las muestras fecales provenientes de psitacinos. Fiennes (1982) no considera a *Pseudomonas* sp. como un miembro de la flora intestinal de aves granívoras. Brittingham *et al.* (1998) en un estudio realizado en un passerino (*Parus atricapillus*), demostraron la prevalencia de varias bacterias, entre ellas *Pseudomonas* sp. (22%), *E. coli* (1%), *Salmonella* spp. (0%), *Streptococcus* spp. (18%), *Staphylococcus* spp. (15%) y *Yersinia* spp. (1%). No encontraron diferencias en la prevalencia de *Pseudomonas* sp. con la dieta sugiriendo que es una especie encontrada raramente en la flora intestinal de aves omnívoras y granívoras.

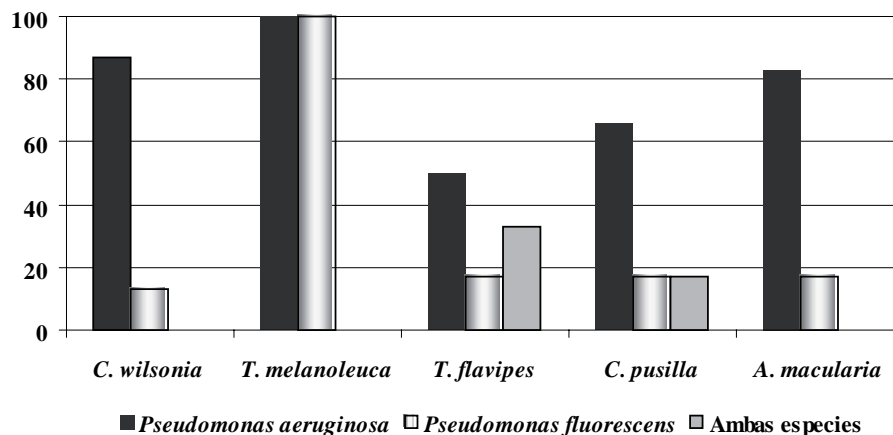


Figura 2. Frecuencia de *Pseudomonas* sp. en aves del orden Charadriiformes.

El orden Charadriiformes está dividido en 3 subórdenes, 18 familias, 85 géneros y 366 especies conocidas, distribuidas por todo el mundo en una amplia variedad de hábitat, aunque la mayoría están asociadas con el agua, tanto dulce como salada. Son aves que van desde un tamaño pequeño al mediano a grande. Quizá sus representantes más conocidos sean las gaviotas de la familia Lariidae. La alimentación es variada, como corresponde a un grupo con tanta diversidad. Desde las mencionadas gaviotas, que son prácticamente omnívoras, aunque se alimentan principalmente de pescado, hasta los que se alimentan de pequeños invertebrados, crustáceos y moluscos, como los limícolas (cuya familia más numerosa es la *Scolopacidae*, a la cual pertenecen *T. melanoleuca*, *T. flavipes*, *C. pusilla* y *A. macularia*). Otra familia incluida en este orden es la Charadriidae la cual se puede alimentar de insectos y vegetales, siendo *C. wilsonia* un representante de esta familia. Todas estas especies tienen hábitos alimenticios tanto diurnos como nocturnos, además utilizan estrategias distintas y eventualmente presas diferentes (Robert *et al.*, 1989). Estas diferencias en la alimentación así como los factores estacionales que influyen en la variedad y cantidad de presas pueden explicar de alguna manera la variación de los resultados obtenidos en esta investigación.

CONCLUSIONES

Se establece por primera vez en Venezuela, y particularmente en el estado Sucre, la presencia de la familia Pseudomonadaceae, con dos especies representativas: *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas fluorescens*. Las cuales, al parecer, forman parte de su flora intestinal.

Queda demostrada la importancia de la identificación de *Pseudomonas* sp. en este grupo de aves, ya que pueden servir como reservorio y agentes de dispersión de estos microorganismos y por ende de enfermedades.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTEKRUSE S., STERN N., FIELDS P., SWERDLOW. D. 1999. *Campylobacter jejuni* an emerging foodborne pathogen. *Emerg. Infect. Dis.*, 5: 28–35.
- BATTISTI A., DI GUARDO G., AGRIMI U., BOZZANO A. 1998. Embryonic and neonatal mortality from salmonellosis in captive bred raptors. *J. Wildl. Dis.*, 34: 64–72.
- BONO M., JEMMI T., BERNASCONI C., BURKI D., TELENTI A., BODMER T. 1995. Genotypic characterization of *Mycobacterium avium* strains recovered from animals and their comparison to human strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 371–373.
- BOWMAN T., JACOBSON E. 1980. Cloacal flora of clinically normal captive psittacines birds. *J. Zoo. An. Med.* 11 :81-85.
- BRITTINGHAM M., TEMPLE S., DUNCAN R. 1988. A survey of selected bacteria in wild birds. *J. Wild. Dis.*, 2: 299-307.
- DOBBIN G., HARIHARAN H., YVES P., HARIHARANA S., HEANEY S., COLESA M., PRICEB L., MUCKLE A. 2005. Bacterial flora of free-living Double-crested cormorant (*Phalacrocorax auritus*) chicks on Prince Edward Island, Canada, with reference to enteric bacteria and antibiotic resistance. *Comp. Immunol. Microbiol. Infec. Dis.*, 28: 71-82.
- DODSON S., MAURER J., HOLT P., LEE M. 1999. Temporal changes in the population genetics of *Salmonella pullorum*. *Avian Dis.*, 43: 685–695.
- HARTUP B., DHONDT A., SYDENSTRICKER K., HOCHACHKA W., KOLLIAS G. 2001. Host range and dynamics of mycoplasmal conjunctivitis among birds in North America *J. Wild. Dis.*, 37: 72–81.
- HOLLAND R., SCHMIDT A., SRIRANGANATHAN N. 1996. Characterization of *Escherichia coli* isolated from fowls. *Vet. Microbiol.*, 48: 243-255.
- LA RAGIONE R., McLAREN M., FOSTER G., COOLEY W., WOODWARD M. 2002. Phenotypic and genotypic characterization of avian *Escherichia coli* O86:K61 isolates possessing a gamma-like intimin. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68: 4932–4942.
- LÉVESQUE B., BROUSSEAU P., BERNIER F., DEWAILLY E. JOLY J. 2000. Study of the bacterial content of ring-billed gull droppings in relation to recreational water quality. *Water Res.*, 34: 1089–1096.
- MACFADDIN J. 1990. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Editorial Panamericana. Tercera edición, Buenos Aires, Argentina, 190-205.
- MAURER J., LEE M., LOBSINGER C., BROWN T., MAIER

- M., THAYER S. 1998. Molecular typing of avian *Escherichia coli* isolates by random amplification of polymorphic DNA. *Avian Dis.*, 42: 431–451.
- NISKANEN T., WALDENSTRÖM J., FREDRIKSSON M., OLSEN B., KORKEALA H. 2003. *virF*-positive *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* found in migratory birds in Sweeden. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69: 4670-4675.
- OGG J., RYDER R., SMITH H. 1989. Isolation of *Vibrio cholerae* from aquatic birds in Colorado and Utah. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55: 95-99.
- PALMGREN H., SELLIN M., BERGSTROM S., OLSEN B. 1997. Enteropathogenic bacteria in migrating birds arriving in Sweden. *Scand. J. Infect. Dis.*, 29: 565–568.
- PALMGREN H., BROMAN T., WÄLDESTROM J., LINDBERG P., ASPAN, A., OLSEN B. 2004. *Salmonella amager*, *Campylobacter jejuni*, and urease- positive thermophilic *Campylobacter* found in free-flying Peregrine Falcons (*Falco peregrinus*) in Sweeden. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 3: 583-587.
- PETERSEN L., NIELSEN M., ENGBERG J., ON S., DIETZ H. 2001. Comparison of genotypes and serotypes of *Campylobacter jejuni* isolated from danis wild mammals and birds and from broiler flocks and humans. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 3115-3121.
- QUESSY S., MESSIER S. 1992. Prevalence of *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. and *Listeria* spp. in Ring-billed Gulls (*Larus delawarensis*). *J. Wildl. Dis.*, 28: 526–531.
- RAPPOLE J., HUBÁLEK Z. 2003. Migratory birds and West Nile virus. *J. Appl. Microbiol.*, 94: 47S–58S.
- ROBERT M., MACNEIL R., LIDUE A. 1989. Conditions and significance of night feeding in shorebirds and other waters birds in a tropical lagoon. *Auk.*, 106: 94-101.
- SAMUEL M., SHADDUCK D., GOLDBERG, D. 2004. Are wetlands the reservoir for avian cholera? *J. Wild. Dis.*, 40: 377–382.
- THOMAS A., FORBES J., SPEARE R., MURRAY C. 2001. Salmonellosis in wildlife from Queensland. *J. Wild. Dis.*, 2: 229–238.
- WALDENSTRÖM J., STEPHEN L., ON L., OTTVALL R., HASSELQUIST D., HARRINGTON C., OLSEN B. 2003. Avian reservoirs and zoonotic potential of the emerging human pathogen *Helicobacter canadensis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69: 7523-7526.