



UNIVERSIDAD DEL AZUAY

FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

ESCUELA DE BIOLOGÍA, ECOLOGÍA Y GESTIÓN

**Aislamiento, identificación y caracterización molecular de los
microorganismos presentes en el caparazón de las tortugas gigantes
(*Chelonoidis porteri*) de la Isla Santa Cruz**

**Trabajo de graduación previo a la obtención del título de:
Bióloga con mención en Ecología y Gestión**

Autoras:

María Paz Guillén Liger
Samara Elizabeth Zeas Bermeo

Directores:

Rodrigo Sebastián Caroca Cáceres Ph.D.
Ainoa Nieto Claudín Ph.D.

**Cuenca - Ecuador
2022**

AGRADECIMIENTOS

A Ainoa y Rodrigo por su confianza, apoyo y retroalimentación en cada etapa de esta aventura.

A todo el equipo del Programa de Ecología de Movimiento de Tortugas de Galápagos (PEMTG), y de manera especial a Gislayne y Freddy por la ayuda brindada.

A la Fundación Charles Darwin (FCD) y la Dirección del Parque Nacional Galápagos (DPNG) por su trabajo en función del bienestar de las islas.

A nuestras familias y amigos que fueron el motor principal de motivación en esta oportunidad que recordaremos con mucho cariño. Además de su amor y apoyo sincero que en todo momento estuvo presente sin importar la distancia o el momento.

Esta publicación tiene el número de contribución 2473 correspondiente a la Fundación Charles Darwin para las Islas Galápagos.

DEDICATORIA

Dedicado a todos quienes trabajan por y para la conservación de las Islas Galápagos.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS

DEDICATORIA

RESUMEN

ABSTRACT

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades

1.2 Islas Galápagos: Especies y su estado de conservación

1.3 Islas Galápagos: Esfuerzos de conservación para las tortugas gigantes

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1 Materiales y métodos

2.1.1 Recolección de muestras

2.1.2 Extracción ADN

2.1.3. Estadística del uso de muestras frescas y congeladas.

2.1.4 Cultivo de microorganismos

2.1.5 Análisis macroscópico y microscópico de los microorganismos cultivados

2.1.6 Selección de oligonucleótidos y amplificación mediante PCR

2.1.7. Purificación, cuantificación y secuenciación de productos de PCR

CAPÍTULO III

RESULTADOS

3.4.1 Cultivos de hongos y bacterias

3.2 Estadística e hipótesis del uso de muestras frescas y congeladas.

3.3 Eficacia del uso de primers seleccionados

3.4.2 Identificación de microorganismos presentes en las muestras del caparazón con lesión.

3.4.3 Identificación de microorganismos presentes en las muestras del caparazón sin lesión

CAPÍTULO IV

DISCUSIONES

CONCLUSIONES

REFERENCIAS

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de la especie <i>C. porteri</i> en la Isla Santa Cruz, Galápagos. Fuente: Reptiles of Ecuador: Life in the middle of the world, Arteaga & Guayasamín (2020).....	9
--	---

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Protocolo PCR aplicado a las muestras de extracción directa y a partir de cultivos.....	17
Tabla 2. Características morfológicas de los cultivos de especies de hongos identificados.....	19
Tabla 3. Características morfológicas -macro y microscópicas- de los cultivos identificados de bacterias.....	20
Tabla 4. Microorganismos aislados/identificados del caparazón con lesión.....	22
Tabla 5. Microorganismos identificados en el caparazón sin lesión.....	23

RESUMEN

Las tortugas de Galápagos son uno de los reptiles más icónicos del mundo. Para identificar los microorganismos presentes en el caparazón de las tortugas de la isla Santa Cruz (*Chelonoidis porteri*), se analizaron 80 muestras (frescas y congeladas) de raspados de caparazón extraídos de zonas aparentemente sanas y zonas afectadas por microorganismos. Las muestras fueron procesadas mediante técnicas de microbiología (cultivos) y biología molecular (PCR) empleando dos tipos de *primers* para hongos (ITS-F/ITS-R y NL-F/NL-R) y uno para bacterias (BSF 820 /1510). Tras la secuenciación, se identificaron 15 microorganismos, ocho de origen fúngico y siete bacterianos. El hongo *Aphanoascus galapagosensis* fue identificado en el 66,7% de las muestras con lesiones, siendo considerado el principal agente causal del crecimiento blanquecino observado en el caparazón de las tortugas de Santa Cruz. Se recomiendan estudios adicionales para comprender la etiopatogenia de este microorganismo y su correlación con la salud de las tortugas.

Palabras clave: *tortugas gigantes, caparazón, agentes fúngicos, Aphanoascus galapagosensis.*



Rodrigo Caroca Cáceres Ph.D
Director del Trabajo de Titulación



Ainoa Nieto Claudin Ph.D.
Directora del Trabajo de Titulación



María Paz Guillén Liger
Autora



Samara Elizabeth Zeas Bermeo
Autora



Antonio Crespo Ampudia Ph.D.
Coordinador de la Escuela de Biología

ABSTRACT

Galapagos giant tortoises are one of main iconic reptiles on Earth. With the aim of identifying the carapace microorganisms of free-living Santa Cruz giant tortoises (*Chelonoidis porteri*) we analyzed a total of 80 carapace scrapes (fresh and frozen). Scrapes were collected from both normally colored carapaces and from white areas potentially affected by microorganisms growth. Samples were processed by culture and molecular (PCR) techniques. Two sets of primers were used for fungi (ITS-F/ITS-R and NL-F/NL-R) and one for bacteria (BSF 820 /1510). After sequencing all PCR-positive products, fifteen microorganisms were identified: eight fungi and seven bacterial species. *Aphanoascella galapagosensis* was isolated in 66.7% of samples obtained from white shell areas. These results suggest that *A. galapagosensis* is the etiologic agent responsible for white shell areas within Santa Cruz tortoise carapaces. Additional research is needed to better understand the pathogenicity of this microorganism and its correlation with tortoise health and wellbeing.

Key words: *giant tortoises, carapace, fungal agents, Aphanoascella galapagosensis.*



Rodrigo Caroca Cáceres Ph.D
Thesis director



Ainoa Nieto Claudin Ph.D.
Thesis director



Antonio Crespo Ampudia Ph.D.
Faculty Coordinator




Translated by
Samara Zeas

María Paz Guillén and Samara Zeas