



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE
HIDALGO

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE LICENCIATURA EN
BIOTECNOLOGÍA

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y MORFOLÓGICA DE AISLADOS BACTERIANOS DE PIEL DE *Ambystoma dumerilii* CON LESIONES

TESIS

Que como requisito parcial para obtener El título
profesional de

LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

Presenta

Fabiola Itzel Loeza Torrero

Director de tesis:
Dra. Yurixhi Maldonado López

Co-Director de tesis:
Dra. Nancy Calderón Cortes



Morelia, Michoacán, Febrero 2022

i. DEDICATORIA

A mis padres por el apoyo brindado en todo momento, sin ellos esto no sería posible.

A mis hermanas por su apoyo en toda mi vida universitaria, por apoyarme no solo anímicamente si no también en todos esos días en los que me acompaño a Laboratorio.

Gracias

ii. AGRADECIMIENTOS

Agradezco a CONACyT, ya que este estudio fue financiado por el proyecto CONACyT-CB-2015-253420 otorgado a la Dra. Nancy Calderón Cortes, el cual fue importante en el desarrollo experimental de este proyecto.

A la asociación Chester Zoo-Proyecto-Conservation Plan for the Achoque (*Ambystoma dumerilii*) in Lake Patzcuaro, Michoacan que con ellos fue posible llevar a cabo el trabajo de campo.

A The Mohamed bin Zayed Species Conservation Fund -182518929 por el financiamiento otorgado al Dr. Luis H. Escalera para llevar a cabo la primera fase de este proyecto.

Al la Escuela Nacional de Estudios Superiores (ENES) Campus Morelia en especial al Laboratorio de Ecología Molecular y Genética por darnos la facilidad de realizar metodologías experimentales en sus instalaciones, y en conjunto con el Instituto de Investigaciones sobre los Recursos Naturales (INIRENA) de la Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo, agradezco a ambas instituciones las cuales me brindaron facilidades para llevar a cabo el proyecto.

Al Centro de Regional de Investigación Acuícola y Pesqueras de Pátzcuaro (CRIAP) de Pátzcuaro, M.C. Andrés Arellano Torres, Ollin Olivia Ramírez y Gerardo León Ceras por proporcionarnos los individuos de achoques enfermos.

A mis asesoras de tesis la Doctora Yurixhi Maldonado López y la Doctora Nancy Calderón Cortes, por la dirección y asesoría durante la realización de este proyecto.

Al Doctor Luis H. Escalera Vázquez por el apoyo en la realización de la tesis dentro del proyecto “Achoque” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Al Doctor Rodolfo Pérez Rodríguez por la donación de los individuos de *A. dumerilii* usados para la experimentación.

Al Doctor Jesús Llanderal Mendoza por el apoyo técnico durante el trabajo de laboratorio.

A la Señora Claudia Brenes por su apoyo en la preparación del material de Laboratorio.

A los docentes de los cuales tuve el privilegio de ser su alumna en la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, ya que todos ellos fueron parte de mi formación académica.

A mis padres Faviola Torrero y Armando Loeza que día con día me apoyaron en este camino, gracias por estar conmigo y creer en mí, gracias por ser mis maestros de vida, por todos esos días de desvelos, por apoyarme académicamente y por nunca dejarme sola, ustedes han sido un gran pilar en mi vida y mi ejemplo a seguir.

A mis hermanas Luisa y Belen por estar en esos momentos más difíciles, siempre me impulsaron a seguir adelante dándome alegría en todo momento.

A mis abuelos Nicolasa López, Francisca Orozco, Cesario Loeza y Agustín Torrero por todos esos consejos que dieron durante mi vida, gracias por ser mis confidentes, por todos los momentos de alegría que viví y por ser parte de mi formación.

A mis tías Alejandra Torrero y Luz Torrero por todo el apoyo que dieron en mi vida universitaria, gracias por todos esos consejos, por creer en mí y por todos esos momentos en los que me ayudaron.

A mis amigos de universidad Alicia, Ángel y Carlos gracias por todos los momentos que pasamos juntos por su apoyo en este proyecto.

A mis amigas Evelyn y Flor, por ser mis confidentes e impulsarme en cada momento, y a mis amigos de trabajo Iliana, Erika y Christopher que me enseñaron a superarme día con día, confiaron en mí y gracias por todos los consejos que me dieron durante mi formación laboral.

Finalmente, a Dios que ha puesto a tantas personas en mi camino que me han ayudado en todo momento.

iii. CONTENIDO

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. ANTECEDENTES	5
2.1 DIVERSIDAD DE LOS ANFIBIOS EN MÉXICO	5
2.2 ENFERMEDADES EMERGENTES EN LOS ANFIBIOS	5
2.3 PATOGENICIDAD MICROBIANA.....	7
2.4 EL PAPEL DE LA MICROBIOTA BACTERIANA DE ANFIBIOS EN LA PROTECCIÓN ANTE PATÓGENOS	9
2.5 DIVERSIDAD Y ESTADO ACTUAL DEL GÉNERO <i>Ambystoma</i> EN MÉXICO ...	11
2.6 ESTADO ACTUAL Y ESTRATEGIAS DE CONSERVACIÓN DE <i>Ambystoma</i> <i>dumerilii</i>	13
2.7 PROBLEMÁTICA DE LA CONSERVACION <i>ex situ</i>	14
3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	16
3.1 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	16
3.2 HIPÓTESIS.....	16
4. OBJETIVOS	16
4.1 OBJETIVO GENERAL	16
4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	16
5. MATERIALES Y MÉTODOS	17
5.1 ESPECIE DE ESTUDIO	17
5.2 MUESTREO	17
5.3 CULTIVO Y AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS.....	18
5.4 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA.....	19
5.5 IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE BACTERIAS.....	20
5.5.1 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE CEPAS AISLADAS	20
5.5.2 IDENTIFICACIÓN POR TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS.....	21
5.5.3 IDENTIFICACIÓN CON TÉCNICAS MOLECULARES	21
5.6 INFECCIÓN EXPERIMENTAL DE ACHOQUES SANOS.....	27
6. RESULTADOS	29

6.1 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LA MORFOLOGÍA COLONIAL	29
6.2 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR.....	32
6.3 INFECCIÓN EXPERIMENTAL DE INDIVIDUOS DE <i>A. dumerilii</i> SANOS.....	39
7. DISCUSIÓN.....	42
8. CONCLUSIONES.....	50
9. BIBLIOGRAFIA.....	51

iv. ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1. Ejemplares de sapo partero común, <i>Alytes obstetricans</i> , con signos de “pata roja”. Recuperado de: Bosh, 2003.	7
Figura 2. Ejemplar de ajolote <i>Ambystoma mexicanum</i> . Autor: Raúl Martínez Becerril. Recuperado de: http://doi.org/10.22201/codeic.16076079e.2019.v20n1.a1	11
Figura 3. Árbol filogenético de los aislados bacterianos y las secuencias con mayor identidad obtenidas de la búsqueda en la base de datos Silva.	37
Figura 4. Observación en microscópica electrónica de barrido de las bacterias aisladas en lesiones de piel de <i>A. dumerilli</i>	39
Figura 5. Lesiones en piel en <i>A. dumerilli</i> expuestos a una infección controlada por <i>Acinetobacter</i>	40

v. CONTINUACIÓN ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Distribución, estado de conservación y diversidad de especies de <i>Ambystoma</i> en el territorio mexicano. NOM-059-SEMARNAT-2010 y la Lista Roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza	11
Tabla 2. Técnicas de sembrado usadas durante a inoculación en medio sólido	18
Tabla 3. Secuencias de los primers usados en el proceso de amplificación y secuenciación del gen ribosomal 16s	24
Tabla 4. Volumen y concentraciones de los componentes de la reacción de amplificación del gen ribosomal 16s en la PCR	24
Tabla 5. Condiciones de temperatura y tiempo usadas para Reacción en Cadena de la Polimerasa.	25
Tabla 6. Volumen y concentraciones de los componentes de la reacción de secuenciación del gen ribosomal 16S.	26
Tabla 7. Coloración de las colonias bacterianas desarrolladas en los medios de cultivo Agar Triptona y Agar Soja Tripticaseina	29
Tabla 8. Identificación taxonómica de las colonias aisladas de lesiones de piel en <i>A. dumerilii</i> . Se muestran el porcentaje de cobertura e identidad de la búsqueda en BLAST y Silva.	32
Tabla 9. Morfología colonial de los aislados recuperados de la piel de individuos de <i>A. dumerilii</i> infectados con <i>Acinetobacter</i> .	41

RESUMEN

Ambystoma dumerilii es una salamandra microendémica del Lago de Pátzcuaro, Michoacán, considerada en peligro crítico en la Lista Roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN), debido al grave deterioro de las condiciones del lago asociada a diferentes impactos antrópicos como contaminación, introducción de especies exóticas y cambio de uso de suelo. Este panorama hace necesario buscar alternativas para su preservación, como es el mantenimiento de poblaciones *ex situ*. Sin embargo, aún en condiciones de cautiverio, estas poblaciones son susceptibles a las enfermedades infecciosas emergentes, que representan la principal amenaza para los anfibios en el mundo.

Por lo tanto, en el presente estudio se aislaron y caracterizaron cepas bacterianas de la piel de individuos de la especie *A. dumerilii* mantenidos en cautiverio que presentaban lesiones cutáneas, con el objetivo de identificar el agente causal de esta enfermedad. Las cepas aisladas se identificaron mediante métodos moleculares utilizando la región V3-V4 del gen ribosomal 16S utilizado como marcador universal para la identificación taxonómica de procariontes. Los aislados bacterianos se caracterizaron morfológicamente mediante microscopía electrónica de barrido. En total se aislaron 12 colonias bacterianas con base en características de crecimiento, a partir de las cuales se identificaron 4 cepas pertenecientes al género *Aeromonas* y 3 cepas de los géneros *Acitenobacter* y *Pseudomonas*. Dos de los aislados bacterianos presentan altos porcentajes de identidad con secuencias reportadas para las especies *Acitenobacter johnsonii* y *Aeromonas salmonicida*, ambas registradas con propiedades patológicas en peces, las cuales podrían ser causantes de la enfermedad presente en *Ambystoma dumerilii* criados en cautiverio, esto podría comprometer la supervivencia de los individuos dificultando la preservación de dicha especie.

Palabras clave

Ambystoma, enfermedades emergentes, cautiverio, patógenos

ABSTRACT

Ambystoma dumerilii is a microendemic salamander from Lake Pátzcuaro, Michoacán, considered critically endangered on the IUCN Red List, due to the serious deterioration of the lake, associated with different anthropic impacts such as pollution, introduction of exotic species and change of land use. This panorama makes it necessary to look for alternatives for their preservation, such as the maintenance of *ex situ* populations. However, even in captivity conditions, these populations are susceptible to emerging infectious diseases, which represent the main threat to amphibians worldwide.

Therefore, in the present study, bacterial strains were isolated and characterized from the skin of individuals of the *Ambystoma dumerilii* species kept in captivity that presented skin lesions, in order to identify the causal agent of this disease. The isolated strains were identified by molecular methods using the V3-V4 region of the 16S ribosomal gene used as a universal marker for the taxonomic identification of prokaryotes. Bacterial isolates were morphologically characterized by scanning electron microscopy (SEM). In total, 20 bacterial colonies were isolated based on growth characteristics, from which 4 strains belonging to the *Aeromonas* genus, and 3 strains of the *Acitenobacter* and *Pseudomonas* genera were identified. Two bacterial isolates present high percentages of identity with sequences reported for the *Acitenobacter johnsonii* and *Aeromonas salmonicida* species, both registered with pathological properties in fish, which could be the cause of the disease present in *Ambystoma dumerilii* bred in captivity, this could compromise the survival of individuals making it difficult to preserve this species.

Keywords

Ambystoma, emerging diseases, captivity, pathogens

1. INTRODUCCIÓN

Los anfibios son uno de los grupos de animales más amenazados con aproximadamente 41% de las especies clasificadas en alguna categoría de peligro de extinción según la lista roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN) (Stuart SN, J. N., Chanson, N. A., Cox, BE, Young, A. S., Rodríguez, D. L., Fischman, R., W., Waller, 2004). Entre los principales factores responsables de la disminución poblacional y extinción de especies a nivel global, se encuentra la pérdida de hábitat y fragmentación de bosques, la exposición a radiación UV, el cambio climático, la introducción de especies invasoras, la presencia de contaminantes químicos en los ecosistemas y las enfermedades infecciosas (Blaustein, A., R., B. A., Han, R. A., Relyea, P. T. J., Johnson, J. C., Buck, S. S., Gervasi, L. B., Kats, 2011; Whitfield, S. M., K. R., Lips, M. A., Donnelly, 2016).

Las enfermedades infecciosas emergentes son uno de los factores de mayor importancia, ya que son responsables de la disminución de muchas poblaciones de anfibios en el mundo (Basanta, M. D., 2019). Los patógenos como virus, hongos o bacterias, generan infecciones que comprometen la sobrevivencia de las poblaciones de anfibios (Bosch, J., 2003; Ortega, A. M., 2006).

Derivado la pérdida y disminución acelerada de las poblaciones de anfibios, en los últimos años se han propuesto diversas estrategias de conservación *ex situ* que incluyen la reproducción de organismos en cautiverio (Mena, H., E., Servín, 2014). La conservación *ex situ* de anfibios requiere de un control que permita el desarrollo adecuado de las especies como la calidad de agua, temperatura y alimentación (Aguilar-Miguel, X., G., Legorreta, G., Casas-Andreu, 2009; Mena, H., E., Servín, 2014). Sin embargo, cuando las condiciones de cautiverio no son las adecuadas, los anfibios son propensos a contraer enfermedades relacionadas con la pobre calidad del agua, alimentación inadecuada o el estrés al que puedan estar sometidos en cautiverio (Servín, E., 2017). Las especies en conservación *ex situ* son frecuentemente afectadas por enfermedades infecciosas causadas por virus, bacterias, hongos o protozoarios (Huacuz, D., 2012, Kast, J., N., Hanna, 2008).

Los patógenos en cautiverio son comunes, como es el caso *Aeromonas hydrophila* (Bosh, J., 2003, Mena H., E., Servín, 2014). Algunas especies de *Flavobacterium*, se han encontrado en anfibios en condiciones de cautiverio y en vida libre. Esta bacteria es causante de flavobacteriosis sistémica, la cual es conocida como “Síndrome de edema” en donde se presentan síntomas como derrames en los sacos linfáticos, edema lingual y congestión visceral (Densmore, C., D., Earl, 2007).

En este sentido, dentro de los anfibios, el género *Ambystoma* que se distribuye a lo largo del continente americano, cuenta con 16 especies endémicas de México (Cordero, A. Y. C., A. R., Ramírez, S. M., Hernández, P. O., Aguilar, 2021), 15 de las cuales se encuentran en algún estatus de peligro de acuerdo a la NOM-059-SEMARNAT-2010 y la Lista Roja de la IUCN. Esto ha derivado en la implementación de estrategias de conservación *ex situ* para distintas especies del género, con la vinculación de diversas instituciones y programas (SEMARNAT, 2018), y el establecimiento de centros de crianza en sistemas controlados (acuacultura). Sin embargo, una problemática importante de estas estrategias de conservación, al igual que lo reportado para otros anfibios, es la aparición frecuente de enfermedades que pueden potencialmente desencadenar eventos de mortalidad que ponen en riesgo la continuidad de los sistemas de reproducción y mantenimiento de los individuos. No obstante, los estudios que identifiquen los agentes causales de estas enfermedades en condiciones de cautiverio son limitados (Mena, H., E., Servín, 2014).

Para *Ambystoma dumerilii*, una especie endémica del lago de Pátzcuaro de gran importancia biológica y cultural, recientemente se registró la emergencia de lesiones cutáneas en individuos criados en cautiverio, con síntomas de infección bacteriana. Por lo anterior, en este estudio se aislaron e identificaron bacterias presentes en estos individuos, para determinar si las bacterias aisladas representan patógenos potenciales de la especie *A. dumerilii* conservada en condiciones *ex situ*, y proveer información necesaria para identificar las alternativas de control de enfermedades infecciosas en organismos mantenidos en

cautiverio, lo cual es de vital importancia para establecer un plan de manejo y conservación de esta especie.

2. ANTECEDENTES

2.1 DIVERSIDAD DE LOS ANFIBIOS EN MÉXICO

La diversidad en especies de anfibios posiciona a México como el quinto país en el mundo más diverso con un total de 376 especies (Parra-Olea, G., O., Flores-Villela, C., Mendoza-Almeralla, 2014), siendo catalogado entre los siete países con mayor diversidad de especies endémicas de anfibios. En México se presentan los órdenes *Anuros* 234 especies, *Caudata* 137 especies, *Gymnophiona* dos especies (Parra-Olea, G., O., Flores-Villela, C., Mendoza-Almeralla, 2014). Entre los estados con mayor diversidad de especies endémicas están Oaxaca con 97 especies, Guerrero con 49 especies, Veracruz con 55 especies, Puebla con 48 especies. Específicamente, en Michoacán se han registrado 54 especies de anfibios (Alvarado-Díaz, J., I., Suazo-Ortuño, O., Medina-Aguilar, 2013) pertenecientes a nueve familias, mismas que representan el 14.5% de la riqueza total de especies endémicas del estado de Michoacán, ubicándolo como el quinto estado con mayor número de endemismos (Parra-Olea, G., O., Flores-Villela, C., Mendoza-Almeralla, 2014).

2.2 ENFERMEDADES EMERGENTES EN LOS ANFIBIOS

Las enfermedades emergentes reportadas para los anfibios son diversas incluyen tanto enfermedades causadas por hongos como por bacterias y virus (Bosch, J., 2003; Ortega, A. M., 2006). Entre los hongos patógenos de anfibios se encuentran *Mariannaea elegans*, *Rhizomucos variabilis* (Lauer, A., M. A., Simon, J. L., Banning, B. A., Lam, R. N., Harris, 2008) y *Amphibiocystidium ranae* (Pereira, C. N., I., Di Rosa, A., Fagotti, F., Simonceli, R., Pascolini, L., Mendoza, 2005), que se manifiestan en forma de úlceras o pequeñas elevaciones hemisféricas que van de 3 a 5 mm (Pereira, C. N., I., Di Rosa, A., Fagotti, F., Simonceli, R., Pascolini, L., Mendoza, 2005). Los dos primeros hongos han sido reportados en huevos de salamandra de *Plethodon cinereus* (Lauer, A., M. A.,

Simon, J. L., Banning, B. A., Lam, R. N., Harris, 2008), mientras que *A. ranae* ha sido reportado en *Rana esculenta* y *Rana lessonae* (Pereira, C. N., I., Di Rosa, A., Fagotti, F., Simonceli, R., Pascolini, L., Mendoza, 2005).

El patógeno emergente de mayor relevancia es el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), el cual está asociado al declive de un elevado número de especies de anfibios en todo el mundo (Wake y Vredenburg, 2008). Los principales signos y síntomas son hiperplasia e hiperqueratosis epidérmica, anorexia, letargo, decoloración de la piel, y posturas anormales (Berger, L., A., Hyatt, R., Speare, J., Longcore, 2005; Nichols, D. K., E. W., Lamirande, A. P., Pessier, J. E., Longcore, 2001). Además, se ha reportado un nuevo hongo patógeno emergente *Batrachochytrium salamandrivorans* (*Bsal*) (Martel, A., A., Spitzen-van der Sluijs, M., Blooi, W., Bert, R., Ducatelle, M. C., Fisher, A., Woeltjer, W., Bosman, K., Chiers, F., Bossuyt, F., Pasmans, 2013), que ataca principalmente especies de salamandras. Por ejemplo, las poblaciones de *Salamandra salamandra* en el sur de Europa, se han visto reducidas debido al hongo *Bsal* (Martel, A., A., Spitzen-van der Sluijs, M., Blooi, W., Bert, R., Ducatelle, M. C., Fisher, A., Woeltjer, W., Bosman, K., Chiers, F., Bossuyt, F., Pasmans, 2013). Al igual que el hongo *Bd*, *Bsal* también ocasiona erosión y ulceraciones en la piel (Martel, A., A., Spitzen-van der Sluijs, M., Blooi, W., Bert, R., Ducatelle, M. C., Fisher, A., Woeltjer, W., Bosman, K., Chiers, F., Bossuyt, F., Pasmans, 2013). Los *Ranavirus* son otra amenaza a las poblaciones de anfibios (Bosh, J., 2003) y sus principales manifestaciones son la inflamación en las extremidades del cuerpo e hígado, hemorragias y aumento de la presión arterial (Gray, M. J., D. L., Miller, J. T., Hoverman, 2009; Wendel, A., E., A., Yaparla, V., D., Koubourli, L., Grayfer, 2017).

Particularmente, se han reportado enfermedades por bacterias que ocasionan un alto porcentaje de daño en los anfibios (Bosh, J., 2003; Pessier, A. P., 2002). Uno de los patógenos bacterianos de mayor importancia es *Aeromonas hydrophila*, agente causal del síndrome de la “pata roja”, en donde los individuos presentan hemorragias en piernas, muslos y abdomen, congestión

pulmonar e incluso presencia de necrosis por lo que la mortalidad es alta (Figura 1) (Bosh, J., 2003; Pessier, A. P., 2002; Pintos, C. M., E. D., Perez, 2016).



Figura 1. Ejemplares de sapo partero común, *Alytes obstetricans*, con signos de “pata roja”. Recuperado de: Bosh, 2003.

2.3 PATOGENICIDAD MICROBIANA

La patogenicidad de un microorganismo se determina por su capacidad de causar daño, esto se debe a los factores de virulencia que posee y el mecanismo de interacción con el huésped (Tibatá, V., M., 2016). Los microorganismos poseen mecanismos que aportan ventajas sobre el hospedero, para llevar a cabo la invasión del hospedero y la evasión del sistema inmunológico para finalmente generar un daño sobre el organismo (Cárdenas-Perea, M. E., O. R., Cruz y López, J., L., Gándara-Ramírez, M. A., Pérez-Hernández, 2014). Los factores relacionados con la patogenicidad se clasifican en tres diferentes grupos: 1) factores que promueven la colonización/invasión como la temperatura, humedad y los nutrientes que se encuentran disponibles para el desarrollo microbiológico

(Banning, J. L., A. L., Weddle, G. W., Wahl III, M. A., Simon, A., Lauer, R. L., Walters, R. N., Harris, 2008) 2) factores que permiten evadir la respuesta inmunitaria como lo son la producción de enzimas como estreptocinasas o desoxirribonucleasas las cuales son tóxicas para células como lo son los fagocitos, la presencia de cápsula que le da una capacidad antifagocítica (Castro, A. M., 2014); 3) factores que causan daño al huésped a causa de toxinas (Cortés, I. L., 2015).

La patogenicidad también se ve mediada por exotoxinas los cuales son secretados en el medio y tienen función de defensa contra el sistema inmune. Estas sustancias suelen liberarse en el medio a causa de la lisis celular, generalmente en bacterias Gram negativas, y pueden ser termoestables a temperaturas mayores de 60°C sin presentar cambios en su toxicidad. Por ejemplo, la hemolisina producida por *Aeromonas hydrophila* es un factor para la generación de necrosis tumoral, por lo que se genera un aumento de la permeabilidad vascular causando edemas y muerte celular (apoptosis) (Rodríguez, M., E., Botero, C. A., Iregui, J., Figueroa, 2005).

El estudio de organismos potencialmente patógenos ha sido una de las áreas más abordadas en los últimos años. Para poder analizar la patogenicidad de un organismo, se necesita aislar el agente patógeno, mediante métodos microbiológicos (Khalifa, A., G., Bekhet, 2018), seguido de esto se lleva a cabo la infección de individuos sanos en condiciones controladas, para ello la colonia se cultiva hasta que se presenta una densidad celular mínima de 7×10^7 UFC/ml (Vásquez, M. A., Rodón, I. S., Restrepo, L. F., Eslava, P. R., 2010). Se exponen a los individuos sanos y se siguen los postulados de Koch que enuncian que: 1) antes de iniciar la experimentación, el microorganismo potencialmente patógeno deberá aislarse de individuos enfermos o que presenten algún síntoma de enfermedad o infección la cual es de interés; 2) el microorganismo aislado deberá someterse a métodos de aislamiento hasta conseguir un cultivo puro; 3) una vez aislado se deben de contar con individuos sanos y la cepa del microorganismo será inoculado. Los individuos inoculados serán monitoreados observando la

manifestación de los síntomas inicialmente detectados; 4) al término de la experimentación el microorganismo deberá ser aislado nuevamente de los signos de infección de los individuos inoculados (Bass, D., G. D., Stentiford, H. C., Wang, B., Koskella C. R., Tyller, 2019). Para ello se deben de considerar protocolos entre los que se incluye el uso del equipo de protección personal adecuado (botas, guantes, bata y lentes de protección) el cual solo debe de usarse dentro de áreas de trabajo para evitar el transporte de agentes infecciosos entre tratamientos, de igual manera se debe de tener aislados de la red general de toma y liberación de agua, así como evitar el traslado de los individuos sin previa desinfección, cuarentena. De igual manera el material que se use (charolas de disección, tubos de ensaye, pipetas, etc.) y mesas de trabajo se deben de lavar y desinfectar, además de esto esterilizar en autoclave el material usado, el material desechable se pondrán en contenedores específicos. Si se generan muestras para almacenamiento deberán de ser etiquetadas y colocarse en contenedores que se encuentren cerrados y en refrigeración (-20°C), para garantizar a inactividad de los agentes infecciosos (Escalera, L., 2016).

Recientemente se han llevado a cabo estudios para determinar la patogenicidad de distintas cepas en anfibios. Por ejemplo, Pacher y Pérez (2016) llevaron a cabo una infección experimental en *Acipenser baerii* (esturión siberiano) en cautiverio. La infección se realizó con la cepa bacteriana *Aeromonas hydrophila* y después del experimento, se observó un aumento de neutrófilos y monocitos, derivado de la infección causada por la cepa bacteriana (Pacher, C., E. D., Pérez, 2016).

2.4 EL PAPEL DE LA MICROBIOTA BACTERIANA DE ANFIBIOS EN LA PROTECCIÓN ANTE PATÓGENOS

La microbiota bacteriana o comunidad de bacterias en los anfibios, incluye a aquellas bacterias que tienen como nicho ecológico órganos del hospedero como son la piel o el aparato digestivo (Alarcón, T., G., D'Auria, R., del Campo, M.,

Ferrer, 2016; García, L., P., Borrowes, M., Dominguez-Bello, 2019). La microbiota de la piel de anfibios, le confiere beneficios como defensa inmunitaria frente a diversos patógenos (Kueneman, J. G., D. C., Woodhams, R., Harris, H., M., Archer, R., Kninght, V., McKenzie, 2016), ya que estos microorganismos generan compuestos químicos con actividad antifúngica, antiviral o antibacteriana (García, L., P., Borrowes, M., Dominguez-Bello, 2019). Por ejemplo, los metabolitos de defensa 2,4- diacetilfloroglucinol, indol-3-carboxaldehído y la violaceína son producidos por simbiontes bacterianos entre los que encontramos *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Lysobacter*, *Pedobacter*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* y *Janthinobacterium* (Lauer, A., M. A., Simon, J. L., Banning, B. A., Lam, R. N., Harris, 2008; Lauer, A., M. A., Simon, J. L., Banning, E, André, K., Duncan, R., N., Harris, 2007; Woodhams, D. C., V. T., Vredenburg, M. A., Simon, D., Billheimer, B., Shkhtour, Y., Shyr, C. J., Briggs, L. A., Rollins-Smith, R. N., Harris, 2007). Los anfibios en cautiverio muestran una menor diversidad de la microbiota en la piel con respecto a los de vida libre. Como se ha visto en *Mantella aurantiaca* (Passos, L. F., G., García, R. J., Young, 2018), *Bombina orientalis* (Bataille, A., L., Lee-Cruz, B., Tripathi, H., Kim, B., Waldman, 2016), *Cynops pyrrhogaster* (Sabino-Pinto, J., M. C., Bletz, M.M., Islam, N., Shimizu, S., Bhujju, R., Geffers, M., Jarek, A., Kurabayashi, M., Vences, 2016), *Triturus cristatus*, *Lissotriton vulgaris* (Bates, K. A., J., M. G., Shelton, V. L., Mercier, K. P., Hopkins, X. A., Harrison, S. O., Petrovan, M. C., Fisher, 2019), *Agalychnis callidryas* (Antwis, R. E., R. L., Haworth, D. J. P., Engelmoer, V., Ogilvy, A. L., Fidgett, R. F., Prezioso, 2014), *Cryptobranchus a. alleganiensis* y *C. a. bishopi* (Hernández-Gómez, O., J. T., Briggler, T. N., Williams, 2019). Esta disminución en la diversidad bacteriana en la piel de los anfibios, puede ocasionar una mayor susceptibilidad a los patógenos (Antwis y Harrison, 2018) con un efecto negativo en la salud del hospedero (Knutie, S. A., L. A., Shea, M., Kupselaitis, C. L., Wilkinson, K. D., Kohl, J. R., Rohr, 2017).

2.5 DIVERSIDAD Y ESTADO ACTUAL DEL GÉNERO *Ambystoma* EN MÉXICO

El género *Ambystoma* se distribuye a lo largo del continente americano, particularmente en México, cuentan con 17 especies (Tabla 1) de las cuales 16 son endémicas a México (Cordero, A. Y. C., A. R., Ramírez, S. M., Hernández, P. O., Aguilar, 2021). Este género es considerado depredador ápice ya que su alimentación está conformada por plancton, crustáceos, insectos, peces pequeños, gusanos y renacuajos (Velarde, T., 2012). Se caracteriza por presentar una cavidad en los costados de su cuerpo, ojos pequeños ausentes de párpados móviles, presenta dientes vomerianos, cabeza ancha, cola aplanada que se encuentra de manera lateral (Figura 2) (Sánchez, D., 2017).



Figura 2. Ejemplar de ajolote *Ambystoma mexicanum*. Autor: Raúl Martínez Becerril. Recuperado de: <http://doi.org/10.22201/codeic.16076079e.2019.v20n1.a1>

Tabla 1. Distribución, estado de conservación y diversidad de especies de *Ambystoma* en el territorio mexicano. NOM-059-SEMARNAT-2010 y la Lista Roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza

ESPECIE	DISTRIBUCIÓN	ESTADO DE CONSERVACIÓN
<i>Ambystoma altamirani</i> <i>Ambystoma leorae</i> <i>Ambystoma rivulare</i>	Valle de México, Morelos, Estado de México y Ciudad de México Puebla y México Estado de México, Michoacán, Guerrero	Amenazada: En peligro crítico

<i>Ambystoma bombypellum</i> <i>Ambystoma dumerilii</i>	Estado de México, Morelia, Michoacán Pátzcuaro, Michoacán	Protección especial: En peligro crítico
<i>Ambystoma flavipiperatum</i>	Tecotlán, Jalisco	
<i>Ambystoma granulosum</i>	Toluca, Estado de México	
<i>Ambystoma amblycephalum</i>	Morelia, Michoacán	
<i>Ambystoma lermaense</i>	Toluca	
<i>Ambystoma andersoni</i>	Zacapu, Michoacán	
<i>Ambystoma taulori</i>	Tepehuayo, Puebla	Protección especial: Críticamente amenazada
<i>Ambystoma mexicanum</i>	Xochimilco, Texcoco, Zumpango, Chalco	Peligro de extinción: En peligro crítico
<i>Ambystoma ordinarium</i>	Zitácuaro, Morelia, Tacámbaro	
<i>Ambystoma mavortium</i> <i>Ambystoma rosaceum</i> <i>Ambystoma velasci</i>	Norte de territorio mexicano Chihuahua, Jalisco, Durango, Nayarit, Sinaloa, Sonora, Michoacán, Estado de México, Puebla, Tlaxcala, Veracruz,	Protección especial: Menor preocupación
<i>Ambystoma silvense</i>	Sierra madre occidental de Durango	---

Quince especies de *Ambystoma* están catalogadas según la NOM-059-SEMARNAT-2010, como especie en riesgo, 11 se encuentran amenazadas y 11 bajo algún tipo de protección especial (SEMARNAT, 2018). En el estado de Michoacán se encuentran siete especies del género *Ambystoma* (Soto, C., 2012) de las cuales tres son endémicas: *Ambystoma dumerilii*, *Ambystoma andersoni* y *Ambystoma amblycephalum* y otras dos son endémicas a Michoacán y Estado de México: *Ambystoma rivulare* y *Ambystoma ordinarium* (Parra-Olea, G., O., Flores-Villela, C., Mendoza-Ameralla, 2014).

En México, se han implementado estrategias de conservación *ex situ* para distintas especies del género *Ambystoma*, ya que es considerado un género prioritario cuyas especies se encuentran en alguna categoría de protección (Aguilar-Miguel, X., G., Legorreta, G., Casas-Andreu, 2009; SEMARNAT, 2018).

Diversas instituciones se han vinculado a la conservación ex situ del género *Ambystoma* como el programa de Acción para la Conservación de las especies de *Ambystoma* (PACE: *Ambystoma*), el cual forma parte del eje de Conservación y Manejo de la Biodiversidad, de la Estrategia de la CONANP 2040 que expresa en la línea estratégica cómo “Desarrollar e implementar programas de acción para la recuperación de especies en riesgo, vinculados con los Programas de Manejo de Areas Naturales Protegidas (ANP)” (Semarnat, 2018). Por ejemplo, existen diversos centros de crianza de especies del género *Ambystoma*, como el Instituto de Biología de la UNAM, el cual trabaja con *Ambystoma mexicanum* (Servín, E., 2011), el Centro de Investigaciones Biológicas y Acuícolas de Cuernavaca dedicado a la reproducción de distintas especies de *Ambystoma* para su conservación.

2.6 ESTADO ACTUAL Y ESTRATEGIAS DE CONSERVACIÓN DE *Ambystoma dumerilii*

Ambystoma dumerilii es una salamandra comúnmente conocida como achóki o ajolote de Pátzcuaro. La etapa reproductiva del Achoque se presenta durante el invierno (Servín, E., 2017). Una vez que llevan a cabo la reproducción realizan la puesta de huevos, se mantendrá en esta etapa hasta que los individuos eclosionen (Huacuz, D., 2012). Presentan un tamaño corporal aproximado de 26 cm, con coloración verde con pequeñas manchas violetas y pardas, mientras que las branquias presentan coloraciones más oscuras. Su alimentación se basa en pequeños peces, crustáceos y anélidos. El Achoque es una especie bentónica, por lo que la mayor parte del tiempo permanece en el fondo y requiere de refugios (Servín, E., 2017).

A. dumerilii es una especie cuyo nicho ecológico es el Lago de Pátzcuaro (SEMARNAT, 2018; Velarde, T., 2012), el cual ha sido considerado como uno de los puntos pesqueros representativos de la región central de México (Berry, J. P., E., Lee, K., Walton, A., Wilson, F., Bernal-Brooks, 2011), sin embargo, ha sido afectado por factores antropogénicos como contaminación, desecación e introducción de especies exóticas, afectando considerablemente la biodiversidad y

especies microendémicas del sitio. De acuerdo con estudios realizados por Huacuz en 2008, el lago ha sufrido alteraciones antropogénicas, como la erosión, resultado de la deforestación causada en la cuenca del lago.

A. dumerilii se encuentra bajo protección especial por estar catalogado en la lista roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UCIN). Actualmente esta especie ha presentado una disminución poblacional ya que su área ocupacional es menos de 10 km² (Servín, E., 2017), por lo que su desarrollo *ex situ* ha representado una de las estrategias de conservación más importantes.

Particularmente las estrategias de conservación de *A. dumerilii* han sido enfocadas en la implementación de las Unidades de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre (UMAs) que se han convertido en una fuente de recursos para los pobladores del sitio y ayuda a la disminución de la sustracción ilegal del achoque. Actualmente la UMA Jimbani Erandi del Monasterio de Nuestra Señora de la Salud de las Monjas Dominicanas mantienen una población importante de *A. dumerilii*, que es utilizada para la elaboración de “jarabe de achoque” usado para enfermedades de vías respiratorias, personas con anemia y desnutrición (Velarde, T., 2011). El Centro Regional de Investigación Acuícola y Pesquera de Pátzcuaro (CRIAP) forma parte de los centros de conservación de la especie ya que se han dedicado a desarrollar métodos para la cría de *Ambystoma* tomando en cuenta las condiciones para que los individuos se desarrollen de manera óptima (Velarde, T., 2011).

2.7 PROBLEMÁTICA DE LA CONSERVACION *ex situ*

La crianza en cautiverio de anfibios es una buena alternativa para la conservación de las especies. Sin embargo, en esta estrategia de conservación las problemáticas asociadas al control de diversos parámetros en cautiverio son frecuentes, ya que los individuos expuestos a condiciones no óptimas dentro del cautiverio que pueden inducir estrés en los anfibios (Aguilar-Miguel, X., G., Legorreta, G., Casas-Andreu, 2009; Servín, E., 2017; Mena, H., E., Servín, 2014).

Las condiciones óptimas de cautiverio para el género *Ambystoma* son de gran importancia e incluyen: contar con un espacio mínimo de 10 litros por cada individuo, así como la presencia de refugios naturales como lo pueden ser plantas acuáticas o refugios artificiales en donde se puede hacer uso de jarros, tubos PVC (Mena, H., E., Servín, 2014). Esta especie es sensible a la luz artificial por ello se recomienda que no estén expuestos directamente a la luz artificial, sin que esta sea nula, recomendándose tener períodos de luz (fotoperiodo) semejante al que se puede encontrar en la vida silvestre (Aguilar-Miguel, X., G., Legorreta, G., Casas-Andreu, 2009; Servín, E., 2017; Mena, H., E., Servín, 2014).

Los parámetros de calidad del agua también tienen una importancia en el estado de salud de los individuos de *Ambystoma* en cautiverio, el agua puede ser usando directamente del grifo usando protocolo para eliminar el cloro que pudiera estar presente, la calidad necesaria por lo que el uso de filtros ideal, este debe de estar a una baja corriente de agua, además los estándares del agua como lo es temperatura 10 - 22°C, pH 6.5 - 8, Nitritos 0 -1 mg/L, Alcalinidad (KH) 0 - 40 ppm y saturación de oxígenos de 80% (Aguilar-Miguel, X., G., Legorreta, G., Casas-Andreu, 2009; Servín, E., 2017; Mena, H., E., Servín, 2014).

A pesar de los esfuerzos por mantener las poblaciones de *Ambystoma* en cautiverio en condiciones óptimas, diversos patógenos suelen estar asociados al estado de salud de especies de *Ambystoma*, como *Aeromonas hydrophila* (Huacuz, D., 2012; Mena, H., E., Servín, 2014). *Escherichia coli* puede desencadenar enfermedades digestivas como resultado de la infección (Mena, H., E., Servín, 2014). El agente causal mayormente conocido por su capacidad de causar afectaciones a *Ambystoma* es *Batrachochytridium dendrobatidis* (Mena, H., E., Servín, 2014). Otro de los parásitos que pueden llegar a causar infecciones en los achoques es *Lerneae spp.* el cual es un crustáceo que se adhiere a la piel del individuo y puede causar inflamación y pérdida de condición corporal (Mena, H., E., Servín, 2014).

3 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

3.1 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existen bacterias patógenas en las lesiones cutáneas de organismos de la especie *Ambystoma dumerilii* manejados en cautiverio que pueden desencadenar eventos infecciosos?

3.2 HIPÓTESIS

Las lesiones cutáneas presentes en individuos de *Ambystoma dumerilii* en condiciones de cautiverio presentan bacterias patógenas capaces de desencadenar un evento infeccioso.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Aislar e identificar molecular y morfológicamente las bacterias cultivables presentes en lesiones en la piel de *Ambystoma dumerilii* en cautiverio y analizar su capacidad patológica por medio de un experimento de infección controlado.

4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Aislar y cultivar colonias bacterianas presentes en la piel de *A. dumerilii* en cautiverio
- Identificar taxonómica con métodos moleculares, a los aislados bacterianos presentes en las lesiones de piel de *A. dumerilii* en cautiverio.
- Describir morfológicamente a los aislados bacterianos presentes en las lesiones de piel de *A. dumerilii* en cautiverio.
- Determinar la capacidad patológica de los aislados bacterianos en individuos sanos, en un experimento de infección controlado.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 ESPECIE DE ESTUDIO

A. dumerilii es una especie de anfibio que pertenece a la familia de *Ambystomatidae*, se distribuye en el Lago de Pátzcuaro, Michoacán, México. *A. dumerilii* es una especie carnívora (Aguilar-Miguel, X., G., Legorreta, G., Casas-Andreu, 2014; Mena, H, E., Servin, 2014; Servin, E., 2017). Presentan una longitud aproximada de 118 mm, cabeza es redonda y aplanada, cola es aplanada de manera lateral, coloración verde claro con pequeños toques de violeta y más claro en la parte inferior, branquias negras, mientras que la aleta caudal va desde la media dorsal hasta el final de la cola (Huacuz, D., 2008; SEMARNAT, 2018; Servín, E., 2017). *A. dumerilii* es además una especie neotenia (Velarde, t., 2012). Su etapa reproductiva ocurre en invierno en los meses de diciembre, enero y febrero (Velarde, T., 2011) y llegan a tener una longevidad de entre 10 - 15 años y presentan sensibilidad a la luz solar (Servín, E., 2017; Velarde, T., 2012). Esta especie está catalogada como Protección especial según la NOM-059-SEMARNAT-2010 y en peligro de extinción según la lista Roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (Huacuz, D., 2008, IUCN, 2021).

5.2 MUESTREO

Las muestras fueron obtenidas de cuatro individuos de *A. dumerilii* en cautiverio que presentaban lesiones cutáneas y enrojecimiento en la piel. Estos individuos han sido criados en cautiverio en un sistema de circulación cerrada en las instalaciones del Centro de Investigación Acuícola y Pesquera (CRIAP) el cual se encuentra en Pátzcuaro, Michoacán, México. Las muestras se tomaron mediante una técnica no invasiva realizando un frotis con hisopos estériles. Uno de los frotis se realizó sobre todo el cuerpo y uno más de manera puntual sobre la zona que presentaba la lesión. Las muestras se tomaron por duplicado resguardándose en microtubos estériles de 1.5 ml que contenían 400 µl de Caldo

Nutritivo estéril. Las muestras se transportaron al laboratorio en hielo y se almacenaron a una temperatura de 4°C hasta su cultivo (uno o dos días posteriores).

5.3 CULTIVO Y AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS

Una vez obtenidas las 8 muestras, estas se separaron y se etiquetaron según el frotis realizado. En seguida se procedió a realizar un sembrado en tres medios sólidos diferentes: R2A-, Agar Triptona y Agar Soja Tripticaseina. Este sembrado se llevó a cabo en condiciones estériles en campana de flujo laminar LABCONO Logic A2. La inoculación se llevó a cabo usando tres técnicas diferentes que se describen en la Tabla 2.

Tabla 2. Técnicas de sembrado usadas durante a inoculación en medio sólido

MATERIAL Y DESCRIPCIÓN DE TÉCNICA

<u>HISOPO</u>	<u>PERLAS DE VIDRIO</u>	<u>ESTRIADO CON ASA MICROBIOLÓGICA</u>
Se realizó siembra por estriado utilizando el hisopo con el que fue tomada la muestra.	Se tomaron 50 µl de caldo nutritivo con micropipeta depositándolo en el medio sólido. Se colocaron de 5-6 perlas de vidrio estériles, distribuyendo la muestra con movimientos horizontales	Esta técnica se llevó a cabo usando el agotamiento de estrías, para que las primeras estrías del sembrado tuvieran un crecimiento bacteriano mayor en comparación con las últimas estrías, generando crecimiento de colonias más aisladas.

Los cultivos se dejaron en incubación a temperatura ambiente en una incubadora microbiológica hasta que las colonias se desarrollaron en medio sólido. La siembra de las colonias se realizó por pases sucesivos hasta obtener colonias aisladas en cada uno de los medios.

Las colonias bacterianas se conservaron en un cepario. Con un palillo de madera estéril se picó el centro de la colonia y se inoculó en 1 ml de Caldo Nutritivo. Se dejó en incubación durante 24 horas a una temperatura de 28°C con agitación constante de 500 rpm hasta observar crecimiento bacteriano. En un ambiente estéril, se procedió a tomar alícuotas de 200 µl de la muestra y se le añadió 20 µl de glicerol (10%). Se mezclaron con ayuda de Vortex (Genie-2) y se resguardaron a una temperatura de -70°C.

5.4 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

La caracterización morfológica de las cepas aisladas se realizó mediante la técnica de Microscopía Electrónica de Barrido. Los aislados bacterianos resguardados en cepario, se volvieron a crecer en caldo nutritivo. Las bacterias se precipitaron mediante centrifugación a 13,000 rpm durante tres minutos (Thermo Scientific Heraeus Centrifuge). Se eliminó el sobrenadante, y se resuspendió el precipitado en 500 µl de buffer de fosfatos (0.2 M), dejándolo en incubación 20 minutos para después realizar una centrifugación a 13,000 rpm durante tres minutos. El sobrenadante se desechó con el uso de una micropipeta y se agregaron 500 µl de Glutaraldehído grado II al 25%, para resuspender el precipitado con ayuda de una pipeta. Las células bacterianas se incubaron durante 24 horas a una temperatura de 4°C.

Una vez concluido el tiempo de incubación, se realizó una centrifugación a 13,000 rpm desechando el sobrenadante con micropipeta, y se realizaron dos lavados. Cada lavado consistió en añadir 500 µl de buffer de fosfatos (0.2 M) para

resuspender el precipitado con ayuda de la micropipeta. La muestra se incubó durante 20 minutos y se centrifugó a 13,000 rpm desechando el sobrenadante. Posteriormente se realizaron lavados con alcohol a distintas concentraciones (30, 50, 70, 80, 90% y absoluto) esto se realizó dos veces con cada una de las concentraciones.

Para cada lavado se añadieron 500 µl de alcohol y se dejó en incubación durante 15 minutos para finalmente hacer una centrifugación, la centrifugación de los lavados con alcohol al 30, 50 y 70% se realizó a 8,000 rpm por 1 minuto mientras que la centrifugación de los lavados con alcohol al 80, 90% y absoluto se realizó a 9,000 rpm durante tres minutos.

Una vez concluidos los lavados, con ayuda de la micropipeta, cada una de las muestras se colocaron en bolsas pequeñas de papel etiquetadas para llevar a cabo el secado de muestras mediante la técnica de punto crítico usando una secadora Autosamdri-815. En este paso las muestras pasan por una purgación de CO₂ durante 20 minutos, para después enfriar a 0°C y finalmente elevar a una temperatura de 31°C bajo una presión de 131 psi. Posteriormente, se aplicó un proceso de metalizado con oro a las muestras, el cual se realizó en una evaporadora DENTONCACUUM DESK C. Para este proceso, las muestras se colocaron un minuto a vacío a 5×10^{-2} Thor y se bañaron en oro, generando una lámina de 30 nm, finalmente las muestras se analizaron en el Laboratorio de Microscopía de la Escuela Nacional de Estudios Superiores, Unidad Morelia en el equipo JEOL JSM-IT300.

5.5 IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE BACTERIAS

5.5.1 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE CEPAS AISLADAS

La identificación bacteriana es un proceso que se puede realizar a través de distintas técnicas moleculares o microbiológicas (Lauer, A., M. A., Simon, J. L., Banning, B. A., Lam, R. N., Harris, 2008). Las técnicas microbiológicas establecen las condiciones ideales para que los microorganismos puedan ser desarrollados *in vitro* y con ello poder observar las características morfológicas que nos permitan

diferenciar una cepa de otra. Por otro lado, las técnicas moleculares nos permiten identificar los organismos presentes analizando la información genética.

5.5.2 IDENTIFICACIÓN POR TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS

En la microbiología tradicional se utilizan medios de cultivo, los cuales cumplen con los requerimientos nutricionales de las bacterias como son: una fuente de carbono, fuente de energía, compuestos de amortiguadores de pH, carbono, nitrógeno, fósforo, sodio, potasio, vitaminas, etc. (Bou, G., A. Fernández, C., García, J. A., Sáez- Nietp, S. Valdezate, 2011; Madigan, M.T., J.M., Martinko, J., Parker, 2004). Al hacer uso de los medios sólidos nos permitirá tener con mayor facilidad colonias bacterianas (Bou, G., A. Fernández, C., García, J. A., Sáez- Nietp, S. Valdezate, 2011). Algunos de los medios usados dentro de la microbiología para el estudio de microbiota de anfibios son R-A2 agar, agar soya Trypticaseina, agar triptona extracto de soya, que favorecen el desarrollo de bacterias en ambientes acuáticos.

Estas técnicas microbiológicas permiten la identificación de las bacterias cultivables (Lauer, A., M. A., Simon, J. L., Banning, K., Duncan, R. H., Harris, 2007). De acuerdo con Schleifer (2004), solo una pequeña proporción de la microbiota es cultivable. Este porcentaje de desarrollo bacteriano en los cultivos está determinado por la imposibilidad de recrear las condiciones de temperatura y humedad del hospedero en los laboratorios.

5.5.3 IDENTIFICACIÓN CON TÉCNICAS MOLECULARES

Las técnicas moleculares como la secuencia del gen 16S rRNA a diferencia de los métodos tradicionales de cultivo, nos otorgan una identificación más precisa de los organismos (Mignard y Flandrois, 2006), y facilita el reconocimiento de enfermedades bacterianas inusuales y emergentes (Drancourt, M., P., Berger, D., Raoult., 2004). Además, estas técnicas permiten la reconstrucción de relaciones filogenéticas (Bou, G., A. Fernández, C., García, J. A., Sáez- Nietp, S. Valdezate,

2011). Una de las técnicas más usadas es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que emplea una polimerasa termoestable, la cual participa en la generación de copias de un fragmento genético específico.

Dentro de la taxonomía bacteriana el segmento genético más usado es la región 16S, considerado un marcador evolutivo (Bou, G., A. Fernández, C., García, J. A., Sáez- Nietp, S. Valdezate, 2011).

La identificación molecular de los aislados de lesiones de piel de *A. dumerilii*, se llevó a cabo mediante las técnicas de extracción de ADN y su amplificación por medio de PCR, de las regiones V3 y V4 del gen ribosomal 16S con el sistema Terra™ PCR Direct (Takaa Bio).

La extracción de ADN se realizó mediante el método modificado por Calderón-Cortés y Llanderal Mendoza (2013). Se transfirió un ml de medio de cultivo en un microtubo de 1.5 ml estéril. Se centrifugaron durante cinco minutos a 8,000 rpm desechando el sobrenadante. Para enseguida añadir un ml de TEN (10mM Tris-Hcl pH8; 1mM EDTA; 100 mM NaCl) y resuspender el sobrenadante con ayuda del vórtex. La muestra se centrifugó nuevamente durante cinco minutos a 8,000 rpm y se desechó el sobrenadante dejando 20 µl de la solución.

En seguida, se añadieron 250 µl de solución amortiguadora (40 mM Tris pH7.8; 20 mM acetato de sodio; 1 mM EDTA; 1% SDS) y microperlas de zirconio para realizar una ruptura membranal con el equipo Tissue lyser a una frecuencia de 30 Hz/segundo. Posteriormente se incubaron las muestras en hielo durante 30 segundos. Este procedimiento se realizó tres veces. Posteriormente se agregaron 60 µl de lizoenzima (10 mM). La muestra se mezcló por inversión y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, la muestra se centrifugó a 8,000 rpm durante ocho minutos y se añadieron 66 µl de NaCl (5 M) mezclando por inversión e incubando por 10 minutos a 50°C. Al finalizar la incubación se realizó una centrifugación a 12,000 rpm durante 10 minutos, recuperando con ayuda de una micropipeta, la fase acuosa del sobrenadante, la cual se transfirió a un microtubo nuevo. Se agregó 0 - 6 volúmenes de Isopropanol

mezclando 20 veces por inversión para dejar en incubación durante 10 minutos a -20°C. Se agregaron 400 µl de etanol (70%), se resuspendió el precipitado y se hizo una última centrifugación a 12,000 rpm durante 10 minutos. Se retiró el alcohol y se secó la pastilla de ADN en una centrifuga de vacío (mi vac DNS concentrator). La pastilla seca se disolvió en 50 µl de agua destilada estéril (DEE). El ADN total obtenido se visualizó mediante la técnica de electroforesis en un gel de agarosa (1.5%) teñido con 0.3 µl del Fluoróforo SYBR safe (Invitrogen, Life Technologies, United Stated). El gel se visualizó en un Fotodocumentador Bio RAD Chemi Doc™MP Imaging system para asegurar la presencia de ADN útil para la amplificación.

La concentración de ADN extraído se determinó con el sistema comercial Qubit 3.0 Fluorometer (Invitrogen, Life Technologies, United Stated). Para ello se realizó una mezcla de 199 µl Qubit Buffer con 1 µl de Qubit ® reagent. De esta mezcla se tomaron 199 µl en nuevos tubos con 1 µl de la muestra de ADN, incluyendo un control positivo con 190 µl de la mezcla y 1 µl tampón Qubit ® para cada estándar. Las muestras se mezclaron con vórtex durante dos o tres segundos y se incubaron durante dos minutos en oscuridad total, para realizar las mediciones.

Para la amplificación del gen ribosomal 16S se usaron los primers Bakt 805R y Bakt 341 F que amplifican la región V3 - V4 (Tabla 3). La mezcla de reacción de PCR utilizada se muestra en la tabla 4, mientras que las condiciones del PCR están descritas en la tabla 5.

Tabla 3. Secuencias de los primers usados en el proceso de amplificación y secuenciación del gen ribosomal 16s.

PRIMER	SECUENCIA del Primer.
Bakt 805 R	GACTACCHVGGGTATCTAATCC
Bakt 341 F	CCTACGGGNGGCWGCAG

Tabla 4. Volumen y concentraciones de los componentes de la reacción de amplificación del gen ribosomal 16s en la PCR.

COMPONENTE	VOLUMEN
Buffer 2x Terra Direct	12.5 μ l
Polimerasa Terra TM PCR Direct (1.25U/ μ l)	0.2 μ l
Primer Bakt 805 R (10 pmol)	1 μ l
Primer Bakt 341 F (10 pmol)	1 μ l
Agua	8.3 μ l
ADN (20 ng/ μ l)	2 μ l
VOLUMEN FINAL	25 μl

Tabla 5. Condiciones de temperatura y tiempo usadas para Reacción en Cadena de la Polimerasa.

TEMPERATURA °C	TIEMPO (minutos:segundos)	CICLOS
98	3:00	
98	00:15	20
60	00:30	
68	00:30	
68	00:30	
10	∞	

Los productos de amplificación se analizaron mediante electroforesis con gel de agarosa al 1.5% teñido con 0.3 µl de fluoróforo SYBR safe (Invitrogen, Life Technologies), en buffer TAE 1X a 90 Voltios durante 40 minutos en la cámara de electroforesis (Thermo scientific, United Stated)

Los productos de amplificación con el peso molecular esperado (~450 bp) se purificaron mediante cromatografía en columna, para lo cual se añadieron 200 µl de Sephacryl-5300 en una columna, que se centrifugaron a 9,000 xg durante dos minutos. Posteriormente se agregaron 200 µl de H₂O miliQ (DEE) y se centrifugó con las primeras condiciones, repitiendo este paso, hasta recuperar el mismo volumen añadido. Finalmente se colocó la muestra en la columna y se centrifugó a 9,000 xg durante tres o cuatro minutos, recolectando la muestra en microtubos estériles de 1.5 ml.

Los productos de amplificación purificados se secuenciaron con el uso del primer 805 R (10 pmol) en un equipo Bigdye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, United States). La mezcla de reacción que utilizó para llevar a cabo la reacción de secuenciación se muestra en la tabla 6. Las reacciones de secuenciación se limpiaron con la resina Illustra™ Sephadex™ G-50 Fine DNA GRADE (Sigma Aldrich, United States) y se empleó un secuenciador ABI PRISM (Genetic Analyzer 3500. Applied Biosystems, United States).

Tabla 6. Volumen y concentraciones de los componentes de la reacción de secuenciación del gen ribosomal 16S.

COMPONENTE	VOLUMEN
5x Sequencing Buffer	2 µl
Buffer RR	1 µl
Primer Bakt 805 R (10 pmol)	1 µl
ADN	3 µl
Agua	3 µl
VOLUMEN FINAL	10 µl

Las secuencias obtenidas se editaron con el programa *Chromas Lite*®, que posteriormente se sometieron a búsqueda en el National Center for Biotechnology Information (NCBI) (*The basic Local Alignment Search Tool: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>*) usando algoritmo BLAST para identificar las secuencias La asignación taxonómica se realizó en la base de datos *Silva high*

quality ribosomal RNA (<https://www.arb-silva.de/aligner/>) a partir de la cual se construyó además un árbol filogenético por el método de máxima verosimilitud incluyendo 10 vecinos más cercanos.

5.6 INFECCIÓN EXPERIMENTAL DE ACHOQUES SANOS

De las cepas aisladas, *Aeromonas hydrophila* y *Acinetobacter* son bacterias patógenas que han sido aisladas de anfibios que presentaban lesiones en la piel (Bosh, J., 2003; Pachón, D., A., 2009). Por ello se seleccionó la cepa *Acinetobacter* (Naranja intenso Colonia puntiforme con un borde entero, elevación de colonia plana, superficie lisa), género bacteriano con la capacidad de presentar características patógenas en reptiles y anfibios, derivado de su comportamiento oportunista (Pessier, A. P., 2002). Este género puede ser aislado en tejidos dañados como consecuencia de traumas o ingesta, y bien beneficiarse de un estado de estrés del individuo por lo que desencadena eventos infecciosos como afecciones cutáneas, dermatitis, etc. (Bocanegra, P., 2013; Pachón, D., 2009) para llevar a cabo la infección de los ejemplares sanos.

Se utilizaron cinco individuos sanos del laboratorio de Biología Acuática perteneciente a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. A partir de las muestras de *Acinetobacter* aislado e identificado a partir de los individuos con lesiones cutáneas en este estudio, una alícuota de las bacterias conservadas en cepario se creció en 10 ml de caldo nutritivo, se incubó durante 24 horas a temperatura ambiente con agitación constante.

Una vez que se observó crecimiento bacteriano, se realizó conteo celular con el uso de Countess II Automated Cell Counter (Thermo Fisher). Se estableció un conteo total de 2×10^9 células/ml para llevar a cabo la infección de individuos sanos, considerando una densidad celular mínima de 1×10^7 células por cada mililitro de medio usados, sugerido por Nya en 2009 para realizar infección de individuos sanos en ambientes controlados (Nya, E. J., B., Austin, 2009). La infección se llevó a cabo colocando a cada uno de los individuos en una charola

en donde se le agrego el medio de cultivo con la cepa seleccionada para que tuvieran contacto directo con la bacteria, esta exposición se realizó durante 10 minutos, este procedimiento se llevó a cabo con cada uno de los individuos.

Los individuos se mantuvieron en peceras en área de cuarentena a una temperatura de 18°C, además de que se les colocó un filtro el cual permitió que se tuviera una aireación constante además de ayudar a la eliminación de cloro que pudiera presentarse en el agua, se alimentaban diariamente y su dieta consistía de lombriz de tierra y trozos de pescado, los individuos fueron monitoreados durante cuatro semanas, para observar cambios morfológicos, en la piel y conducta. Se tomaron muestras realizando un frotis con hisopos estériles, antes y después del experimento, tomando muestras de todo el cuerpo y muestras puntuales sobre la zona que presentaban lesiones posteriores a la exposición al patógeno. Todas las muestras se realizaron por duplicado resguardándose en microtubos estériles de 1.5 ml que contenían 400 µl de Caldo Nutritivo estéril. Las bacterias aisladas de los individuos infectados en este experimento se inocularon en medios de cultivo para su aislamiento e identificación como se describió anteriormente.

6. RESULTADOS

6.1 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LA MORFOLOGÍA COLONIAL

Se aislaron 18 colonias en los tres medios de cultivo, se observaron las características de las colonias y fueron agrupados según sus características de color, entre las que encontramos colonias con coloración amarilla, café claro, rosa, naranja fuerte, blanca, naranja claro, como se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7. Coloración de las colonias bacterianas desarrolladas en los medios de cultivo Agar Triptona y Agar Soja Tripticaseina

MUESTRA	MEDIO	COLORACIÓN	FORMA DE CRECIMIENTO
Muestra 1	Agar Triptona	Amarillo claro	Crecimiento en toda la placa, con borde lobulado, elevación convexa, con consistencia membranosa.
Muestra 2	Agar Triptona	Amarillo claro	Crecimiento en toda la placa, con borde lobulado, elevación convexa, con consistencia membranosa.
Muestra 3	Agar Triptona	Amarillo claro	Crecimiento en toda la placa, con borde lobulado, elevación convexa, con consistencia membranosa.
Muestra 4	Agar Triptona	Naranja intenso	Colonia puntiforme con un borde entero, elevación de colonia plana, superficie lisa.
Muestra 5	Agar Triptona	Rosa	Borde entero, elevación plana, superficie lisa, consistencia cremosa y coloración rosada.
Muestra 6	Agar Triptona	Blanco- Crema	Crecimiento uniforme, borde entero, elevación de colonia plana, superficie lisa, consistencia cremosa de

			coloración blanca.
Muestra 7	Agar Triptona	Naranja intenso	Colonia puntiforme con un borde entero, elevación de colonia plana, superficie lisa.
Muestra 8	Agar Triptona	Rosa	Borde entero, elevación plana, superficie lisa, consistencia cremosa y coloración rosada.
Muestra 9	Agar Triptona	Naranja intenso	Colonia puntiforme con un borde entero, elevación de colonia plana, superficie lisa.
Muestra 10	Agar Triptona	Blanco- Crema	Crecimiento uniforme, borde entero, elevación de colonia plana, superficie lisa, consistencia cremosa de coloración blanca.
Muestra 11	Agar Soja Trypticaseina	Rosa	Borde entero, elevación plana, superficie lisa, consistencia cremosa y coloración rosada.
Muestra 12	Agar Soja Trypticaseina	Rosa	Borde entero, elevación plana, superficie lisa, consistencia cremosa y coloración rosada.
Muestra 13	Agar Soja Trypticaseina	Rosa	Borde entero, elevación plana, superficie lisa, consistencia cremosa y coloración rosada.
Muestra 14	Agar Soja Trypticaseina	Blanco- Crema	Presenta colonias circulares con un borde entero, una elevación de colonia plana, con superficie lisa, consistencia cremosa y un color blanco.
Muestra 15	Agar Soja Trypticaseina	Amarillo claro	Crecimiento rizoide, borde lobulado, elevación convexa, consistencia membranosa, coloración amarilla.

Muestra 16	Agar Soja Trypticaseina	Amarillo Claro	Crecimiento rizoide, borde lobulado, elevación convexa, consistencia membranosa, coloración amarilla.
Muestra 17	Agar Soja Trypticaseina	Amarillo claro	Crecimiento rizoide, borde lobulado, elevación convexa, consistencia membranosa, coloración amarilla.
Muestra 18	Agar Soja Trypticaseina	Blanco- Crema	Colonias circulares con borde entero, elevación de colonia plana, superficie lisa, consistencia cremosa y color blanco.

6.2 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

Una vez obtenidos los resultados de la búsqueda de las secuencias se obtuvieron los porcentajes de cobertura e identidad de cada uno de los aislados bacterianos. Los resultados muestran que las cepas aisladas pertenecían a tres géneros diferentes: *Acinetobacter*, *Pseudomonas* y *Aeromonas* (Tabla 8).

Tabla 8. Identificación taxonómica de las colonias aisladas de lesiones de piel en *A. dumerilii*. Se muestran el porcentaje de cobertura e identidad de la búsqueda en BLAST y Silva.

COLONIA	NOMBRE DE BACTERIA EN BÚSQUEDA EN BLAST	PORCENTAJE DE COBERTURA EN BLAST	PORCENTAJE DE IDENTIDAD EN BLAST	PORCENTAJE DE IDENTIDAD EN SILVA	SCORE SILVA
Amarillo claro, Crecimiento en toda la placa, con borde lobulado, elevación convexa, con consistencia membranosa.	<i>Acinetobacter sp.</i>	100%	98.81%	98.57%	97%
Amarillo claro, Crecimiento en toda la placa, con borde lobulado, elevación convexa, con consistencia membranosa.	<i>Acinetobacter sp.</i>	100%	96.06%	95.37%	90%
Amarillo claro, Crecimiento en toda la placa, con borde lobulado, elevación convexa, con consistencia	<i>Pseudomonas protegens</i>	100%	100%	100%	100%

membranosa.					
Naranja intenso Colonia puntiforme con un borde entero, elevación de colonia plana, superficie lisa.	<i>Uncultured Acinetobacter</i>	100%	91.55%	88.76%	89%
Rosa, borde entero, elevación plana, superficie lisa, consistencia cremosa y coloración rosada.	<i>Acinetobacter sp.</i>	99%	99.76%	99.29%	98%
Blanco- Crema, colonias circulares con borde entero, elevación de colonia plana, superficie lisa, consistencia cremosa y color blanco.	<i>Pseudomonas protegens</i>	100%	99.52%	99.52%	98%
Naranja intenso Colonia puntiforme con un borde entero, elevación de colonia plana, superficie lisa.	<i>Acinetobacter sp.</i>	100%	99.53%	99.29%	98%
Rosa, borde entero, elevación plana, superficie lisa, consistencia cremosa y	<i>Acinetobacter sp.</i>	100%	95.98%	94.47%	91%

coloración rosada.					
Naranja intenso Colonia puntiforme con un borde entero, elevación de colonia plana, superficie lisa.	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	94%	87.12%	80%	77%
Blanco- Crema, colonias circulares con borde entero, elevación de colonia plana, superficie lisa, consistencia cremosa y color blanco.	<i>Aeromonas hydrophila</i>	100%	95.01%	91.92%	85%
Rosa, borde entero, elevación plana, superficie lisa, consistencia cremosa y coloración rosada.	<i>Aeromonas veronii</i>	100%	99.75%	99.75%	99%
Rosa, borde entero, elevación plana, superficie lisa, consistencia cremosa y coloración rosada.	<i>Aeromonas veronii</i>	100%	95.49%	94.05%	88%
Rosa, borde entero, elevación plana, superficie lisa, consistencia cremosa y coloración rosada.	<i>Uncultured bacterium</i>	99%	93.90%	90.87%	84%

Blanco- Crema, colonias circulares con borde entero, elevación de colonia plana, superficie lisa, consistencia cremosa y color blanco.	<i>Aeromonas hydrophila</i>	99%	94.33%	92.45%	84%
Amarillo claro, Crecimiento en toda la placa, con borde lobulado, elevación convexa, con consistencia membranosa.	<i>Aeromonas sp.</i>	100%	89.91%	85.65%	79%
Amarillo claro, Crecimiento en toda la placa, con borde lobulado, elevación convexa, con consistencia membranosa.	<i>Uncultured organism</i>	100%	94.75%	91.89%	87%
Amarillo claro, Crecimiento en toda la placa, con borde lobulado, elevación convexa, con consistencia membranosa.	<i>Pseudomonas protegens</i>	99%	100%	99.75%	99%
Blanco- Crema, colonias circulares con borde entero, elevación de colonia plana, superficie	<i>Acinetobacter sp.</i>	100%	99.75%	99.51%	99%

lisa, consistencia cremosa y color blanco.					
--	--	--	--	--	--

La asignación taxonómica obtenida mediante las búsquedas en BLAST y SILVA se confirmaron mediante un análisis filogenético de las secuencias obtenidas. Los resultados de este análisis filogenético (Figura 3) confirman que los aislados bacterianos de las lesiones cutáneas de individuos de *Ambystoma dumerilii* se agrupan en tres clados de bacterias Gammaproteobacterias, que corresponden a los géneros: *Pseudomonas* (*Pseudomonadaceae*), *Aeromonas* (*Aeromonadaceae*) y *Acinetobacter* (*Moraxellaceae*). Es importante resaltar que los tres géneros identificados contienen especies que han sido reportadas como agentes causales de infecciones en anfibios como *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas fluorescens* y *Acinetobacter* sp., teniendo como grupo más cercano bacterias como *Aeromonas hydrophila* y *Acinetobacter* los cuales tienen evidencia bibliográfica de ser agentes causales de infecciones en anfibios (Pachón, A., 2009).

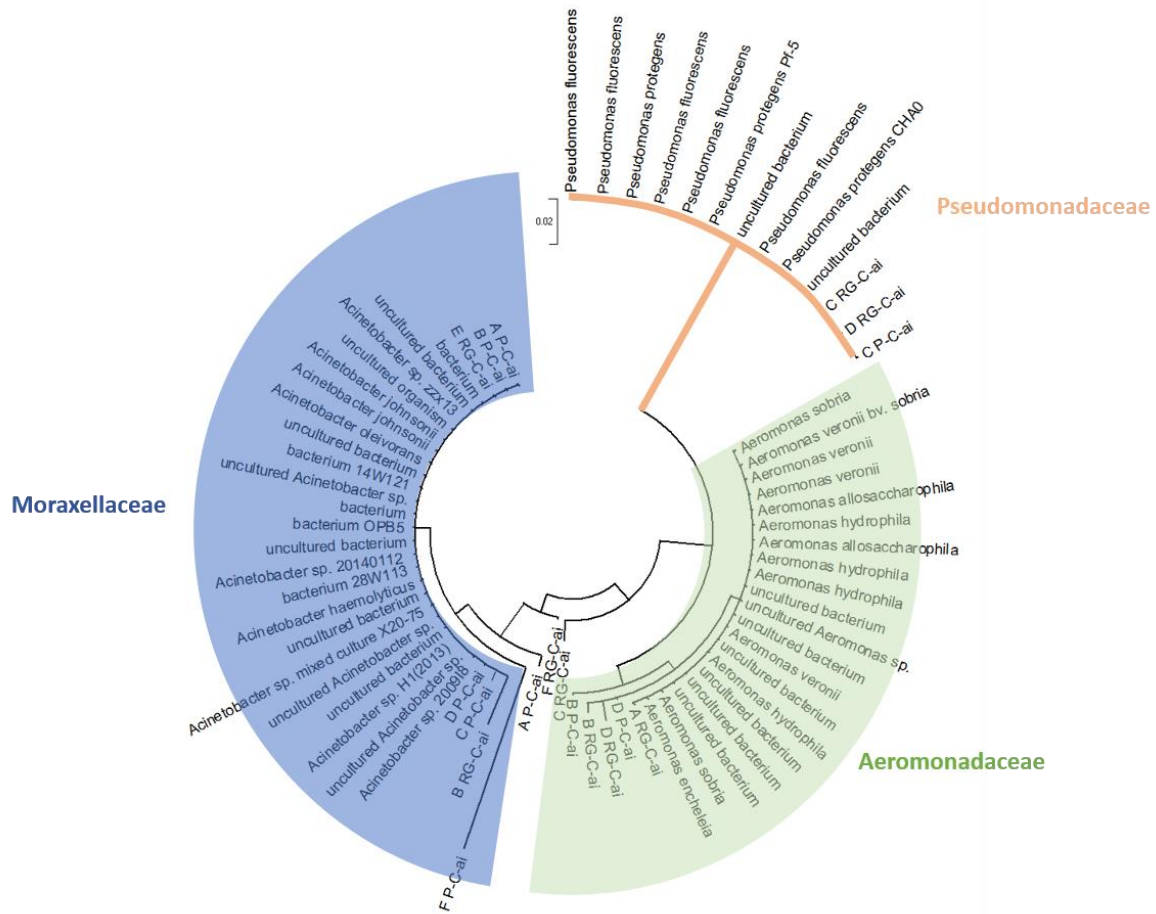
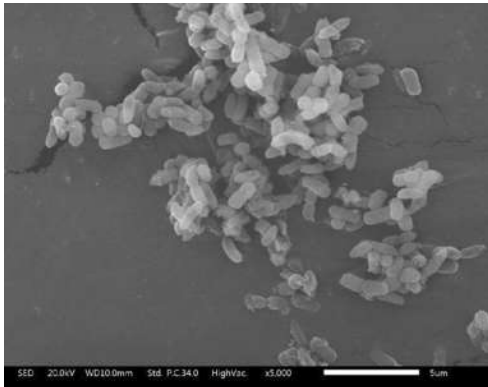
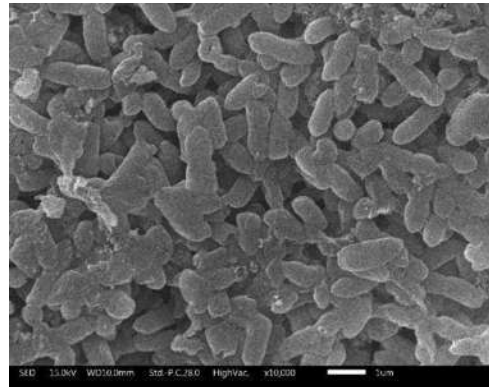


Figura 3. Árbol filogenético de los aislados bacterianos y las secuencias con mayor identidad obtenidas de la búsqueda en la base de datos Silva.

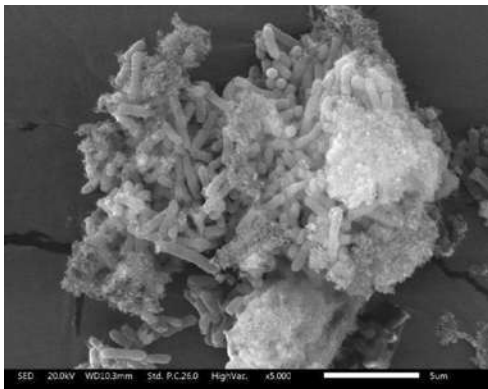
La morfología de las colonias fue observada por microscopía electrónica de barrido, donde se observó la presencia de forma de bacilos y bacilo-cocos agrupados (Figura 4).



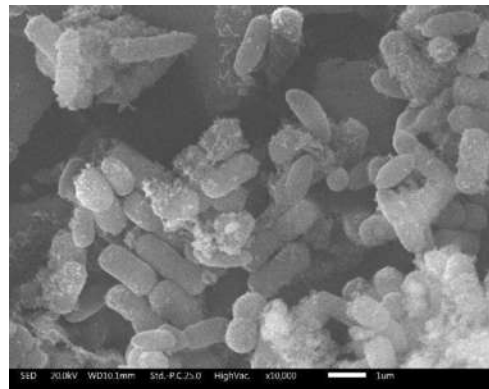
Acinetobacter sp.



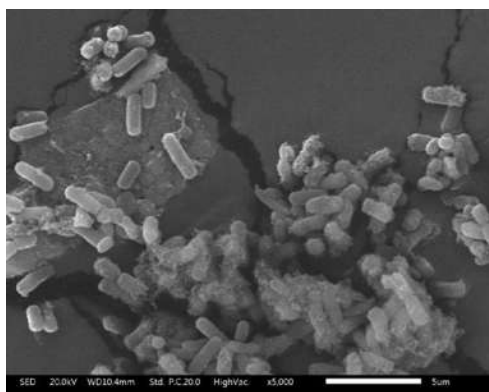
Aeromonas veronii



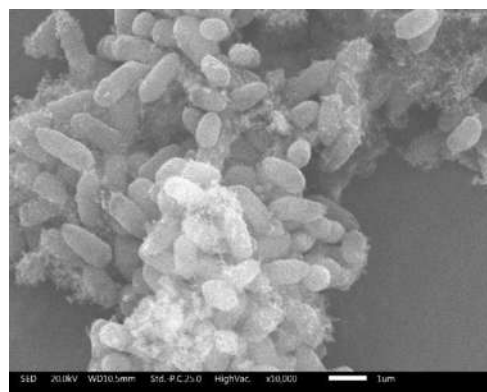
Aeromonas sp.



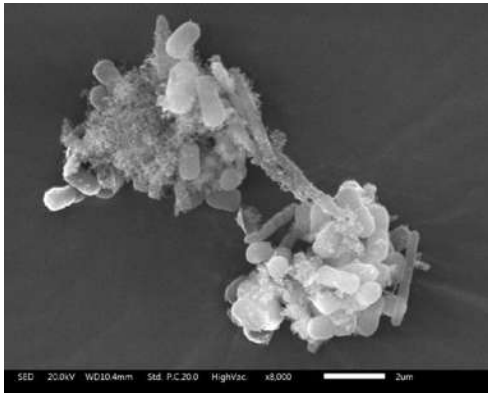
Acinetobacter sp.



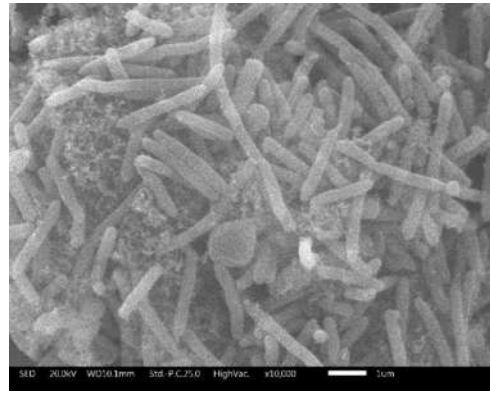
Pseudomonas protegens



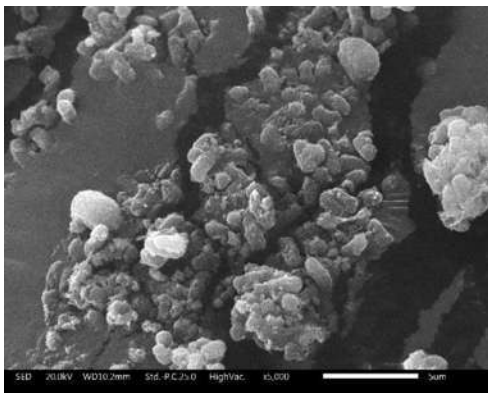
Aeromonas hydrophila



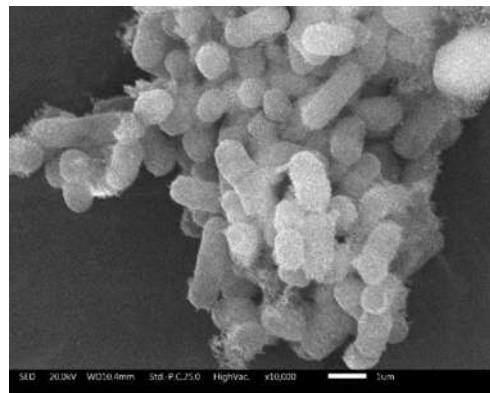
Aeromonas sp.



Aeromonas sp.



Uncultured Acinetobacter



Acinetobacter johnsonii

Figura 4. Observación en microscópica electrónica de barrido de las bacterias aisladas en lesiones de piel de *A. dumerilii*

6.5 INFECCIÓN EXPERIMENTAL DE INDIVIDUOS DE *A. dumerilii* SANOS

Una vez realizada la infección de los individuos con la cepa *Acinetobacter* (Naranja intenso colonia puntiforme con un borde entero, elevación de colonia plana, superficie lisa) se realizó el monitoreo de los achokes en cautiverio en condiciones ambientales controladas (Tabla 9) y después de un mes se observaron lesiones de coloración rojiza en la piel (Figura 5) y posteriormente los ejemplares murieron.



Figura 5. Lesiones en piel en *A. dumerilli* expuestos a una infección controlada por *Acinetobacter*

A partir de los frotis tomados a individuos infectados, se aislaron 12 colonias bacterianas con morfología colonial variable (Tabla 9), algunos de los cuales corresponden a la morfología colonial de la cepa con la cual se realizó la infección.

Tabla 9. Morfología colonial de los aislados recuperados de la piel de individuos de *A. dumerilii* infectados con *Acinetobacter*.

COLORACIÓN DE LA COLONIA	AISLADO
Naranja	1
Rosa	2
Blanco-rosado	3
Roja	4
Blanco-rosado	5
Naranja claro	6
Naranja	7
Blanca	8
Blanca	9
Blanco	10

7. DISCUSIÓN

Nuestros resultados muestran la presencia de tres géneros de bacterias: *Aeromonas*, *Acinetobacter* y *Pseudomonas*, en lesiones de piel de *A. dumerilii*. De estos tres géneros, uno ha sido ampliamente estudiado como parte de la microbiota de piel de anfibios, mientras que los otros dos géneros han sido reportados como patógenos. Las cepas del género *Pseudomonas* son residentes comunes de la microbiota de la piel de otros anfibios como las ranas *Atelopus spurrelli* (Woodhams, D. C., H., Brandt, S., Baumgartner, J., Kielgast, E., Küpfer, U., Tobler, L.R., Davis, B. R., Schmidt, C., Bel, S., Hodel, R., Knight, V., McKenzie, 2014), *A. elegans*, *A. aff. Limosus* (Flechas, S. V., C., Sarmiento, M.E., Cárdenas, E.M., Medina, S., Restrepo, A., Amézquita, 2012), *G. riobambae* (Bresciano, J.C. C. A., Salvador, C., Paz-y-Miño, A. M., Parody-Merino, J., Bosch, D. C., Woodhams, 2015), *Boana prasina* (Brunetti, A. E., M. L., Lyra, W. G. P., Melo, L. E., Andrade, P., Palacios-Rodríguez, B: M., Prado, C. F. B., Haddad, M. T., Pupo, N. P., Lopes, 2018), y *Rana mucosa* (Myers, J. M., J. P., Ramsey, A. L., Blackman, A. E., Nichols, K. P. C., Minbiole, R. N., Harris, 2012). De igual manera, Guzmán-Hernández en 2020, identificaron 13 géneros de bacterias asociadas a la piel de *Ambystoma ordinarium*, entre las que se encontraron diversas especies de *Pseudomonas* (Guzmán. X., 2020).

En el caso del género *Acinetobacter*, se ha reportado en *Ambystoma tigrinum* en condiciones de vida libre, donde los autores atribuyen la alta mortalidad de esta especie, a una infección por *Acinetobacter* (Worthylake, K., P., M., Hovingh, 1989). *Acinetobacter* ha sido fuertemente relacionada con afectaciones cutáneas como dermatitis y úlceras, así como necrosis en especies de anuros como *Rhino derma darwini* (Chang, C. W., B. H., Huang, S. M., Lin, C. L., Huang, P. C., Liao, 2016).

Para especies de *Ambystoma* en cautiverio y vida libre, *Aeromonas hydrophila* es un patógeno reconocido (Bosh, J., 2003; Rivas, Z. P., 2016; Velarde, T., 2011). Es una bacteria con forma de bacilo Gram negativa con capacidad de movilidad que forma parte del microbiota intestinal de peces, sin embargo, puede tener comportamiento antagonista al verse comprometido el sistema inmune del

individuo. *Aeromonas hydrophyla* es capaz de generar daños como consecuencia de su capacidad de generar aerolisina, toxina que destruye los glóbulos rojos. Este patógeno es principal causante de la enfermedad denominada “la pata roja”, que se caracteriza por la generación de síntomas como anorexia, hinchazón, edema, ulceraciones y necrosis en distintas especies de anuros (Rivas, Z., 2016).

El hallazgo de dos géneros de especies bacterianas patógenas en individuos de *A. dumerilii* en condiciones de cautiverio, puede estar asociado al hecho de que las especies de anfibios en cautiverio, presentan una disminución en la diversidad de la microbiota en la piel de anfibios, en comparación con especies de vida silvestre (Kueneman, J. G., D. C., Woodhams, R., Harris, H. M., Archer, R., Knight, V. J., McKenzie, 2016; Sabino-Pinto, J., M. C., Bletz, M. M., Islam, N., Shimizu, S., Bhujju, R., Geffers, M., Jarek, A., Kurabayashi, M., Vences, 2016). Esto debido a que la comunidad bacteriana de la piel de los anfibios, actúa como controlador biológico de patógenos, estimulando la secreción de péptidos antimicrobianos con capacidad de generar la disrupción de la membrana celular (Apponyi, M. A., T. L., Pukala, C. S., Brinkworth, V. M., Maselli, J. H., Bowie, M. J., Tyler, G. W., Booker, J. C., Wallace, J. A., Carver, F., Separovic, J., Doyle, L. E., Llewellyn, 2004; Brito de Asis, A., C., de Santos, F. P., Dutra A., de Oliveira Motta, F. S., Costa, C. A., Navas, B. S., Magalhaes, C. C., Barreto, 2016; Woodhams, D. C., K., Ardipradja, R. A., Alford, G., Marantelli, L. K., Reinert, L. A., Rollins-Smith, 2007). Aunque aún son pocos estudios en cautiverio sobre la microbiota en la piel de los anfibios (Becker, M. H., C. L., Richard-Zawacki, B., Gratwicke, L. K., Belden, 2014; Loudon, A. H., D. C., Woodhams, L. W., Parfrey, H., Archer, R., Knight, V., McKenzie, R. N., Harris, 2014), algunos autores han propuesto que esta disminución hace más susceptibles a los anfibios a la infección por patógenos (Sabino-Pinto, J., M. C., Bletz, M. M., Islam, N., Shimizu, S., Bhujju, R., Geffers, M., Jarek, A., Kurabayashi, M., Vences, 2016).

Las bacterias que se han asociado a la microbiota natural de piel de *Ambystoma* de vida libre incluyen los géneros: *Bacillus*, *Hafnia*, *Lysinibacillus*, *Microbacterium*, *Rhizobium*, *Pedobacter* y *Pseudomonas* (Bresciano, J. C., C. A.,

Salvador, C., Parody-Merino, J., Bosh, D. C., Woodhams, 2015; Dermircan, T., G., Ovezmyradov, B., Yildirim, I., Keskin, A. E., Ilhan, E. C., Fescioglu, G., Ozturk, S., Yildirim, 2018; Myers, J. M., J. P., Ramsey, A. L., Blackman, A. E., Nichols, K. P. C., Minbiole, R. N., Harris, 2012). Las bacterias del género *Pseudomonas* han sido aisladas en salamandras, mostrando inhibición del *Bd* a través de ensayos *in vitro* (Harris, R. N., T. Y., James, A., Lauer, M. A., Simon, A., Patel, 2006). De manera similar, especies de *Bacillus* han sido consideradas como bacterias con capacidad probiótica que ha sido reportada y utilizada previamente en distintos anfibios (Franca, F. M., D. de C., Dias, P. C., Teixeira, A. S., Marcantonio, M. V. D., Stéfani, A., Antonucci, 2008; Freitas, J. J. G., P., Viau, C. A., Oliviera, P. C., Teixeira, L., Tachibana, D., de Carlos Dias, M., Hipolito, I. C. C., Bordon, S. R., Alfaia, C. M., Ferreira, 2017; Woodhams, D. C., R. A., Alford, R. E., Antwis, H., Archer, M. H., Becker, L. K., Belden, S. C., Bell, M., Bletz, J.H., Daskin, L. R., Davis, S. V., Flechas, A., Lauer, A., Gonzalez, R. N., Harris, W. M., Holden, M. C., Hughey, R., Ibañez, R., Knight, F., Roman-Rodríguez, S. D., Shaw, J. B., Walke, V., McKenzie, 2015). En especies de *Atelopus elegans* en cautiverio y vida libre, se han aislado *Aeromonas*, *Citrobacter* sp. Y *Acinetobacter* con actividad anti-*Bd*, y *Chryseobacterium* con actividad anti-*Bd* en individuos de la especie *Atelopus aff Limosus* en vida libre y cautiverio (Flechas, S. V., A., Blasco-Zúñiga, A., Merino-Viteri, V., Ramírez-Castañeda, M., Rivera, A., Amézquita, 2017).

En nuestro estudio aislamos cepas de *Pseudomonas* que se han reportado como inhibidoras del crecimiento de patógenos, por lo cual es posible que la presencia de estas cepas bacterianas brinde protección a los achokes. Sin embargo, el efecto de la presencia de *Acinetobacter* y *Aeromonas*, es más difícil de predecir debido a que cepas de estas bacterias, además de estar reportadas como patógenos de anfibios, también podrían inhibir infecciones por *Batrachochytridium dendrobatidis* (*Bd*) como mencionó anteriormente (Woodhams, D. C., R. A., Alford, R. E., Antwis, H., Archer, M. H., Becker, L. K., Belden, S., C., Bell, M., Bletz, J. H., Daskin, L. R., Davis, S. V., Flechas, A., Lauer, A., Gonzalez, R. N., Harris, W. M., Holden, M. C., Hughey, R., Ibañez, R., Knight, J., Kueneman, F., Rabemananjara, L. K., Reinert, L. A., Rollins-Smith, F., Roman-Rodríguez, S.

D., Shaw, J. B., Walke, V., MacKenzie, 2015). No obstante, es importante resaltar que el posible papel de protección de estas bacterias se ha propuesto a partir de estudios de especies de anfibios de vida libre con comunidades microbianas más diversas, en las cuales la abundancia de cada miembro de la comunidad puede ser regulada por la abundancia de otras especies, sugiriendo que el papel de los microorganismos de la piel de los anfibios puede cambiar en condiciones de cautiverio, donde las comunidades microbianas son por lo general menos diversas.

Debido a lo anterior, en este estudio se realizó un experimento de infección en condiciones controladas con una cepa de la especie *Acinetobacter* aislada previamente de las lesiones cutáneas de achoques. Durante este experimento, los achoques infectados no sólo desarrollaron lesiones de coloración rojiza en la piel, sino que posteriormente todos ejemplares infectados murieron. Estos resultados sugieren que la exposición a una concentración tan alta de *Acinetobacter* sp aislada de los individuos con lesiones cutáneas usada para la infección de individuos sanos, puede desencadenar eventos de mortalidad al actuar como patógenos del achoque en cautiverio.

Estudios previos en los que se han realizado infecciones controladas en *Ambystoma* spp. son limitados, y los que existen, generalmente se han llevado a cabo con hongos, mientras que el estudio enfocado a bacterias patógenas ha sido poco explorado. Por ejemplo, Jacquelyn M del Valle y Heather L Eisthen (2019) llevaron a cabo un estudio de infección controlada por Bd en *Ambystoma mexicanum*, en donde se registró muerte de algunos individuos infectados. Sin embargo, la muerte de los organismos en este estudio se debió a contaminación por *Aeromonas hydrophila* que causó dermatitis y erosión epidérmica y finalmente la muerte de los individuos (Del Valle, J. M., H. L., Eisthen, 2019). Esto indica que la infección por una bacteria altamente patogénica, puede conducir a la muerte de individuos de *Ambystoma* de otras especies en condiciones controladas, al igual que lo observado en nuestro estudio con *A. dumerilii*.

Una característica importante de las bacterias del género *Acinetobacter* aisladas en nuestro estudio, es la capacidad de formación de biopelículas, característica de gran importancia que le permite a las bacterias mostrar un comportamiento de agregación (O`toole, G., H. B., Kaplan, R., Kolter, 2000), y que se logra a través del mecanismo *quorum sensing* (Shapiro, J. A., 1998; March, J. C., W. E., Bentley, 2004). La capacidad de generación de biopelículas ha sido un tema muy poco abordado en los estudios sobre la microbiota de los anfibios. Sin embargo, se ha visto que esta propiedad de algunas comunidades bacterianas tiene mucha importancia al momento de realizar diseños de probióticos para su uso en tratamientos contra enfermedades infecciosas (Piovia-Scott, J., D., Rejmanek, D. C., Woodhams, S. J., Worth, H., Kenny, V., McKenzie, S. P., Law,er, J. E., Foley, 2017).

Para las bacterias patógenas, se ha sugerido que la producción de biopelículas es un factor de virulencia al conferir resistencia a los agentes bactericidas (Rasmussen-Ivey, C. R., M. J., Figueras, D., McGarey, M. R., Liles, 2016) y adherirse a las células del huésped, característico de la primera etapa del proceso de infección (Dias, A., Borges, M. J., Saavedra, M., Smoes, 2018). Por ejemplo, *Acinetobacter* presenta esta capacidad que ha sido asociada a su papel como agente patógeno en individuos de *Rana catesbeiana*, los cuales presentan signos de septicemia, además de desarrollar picazón, aunque la infección presenta variación a diferentes temperaturas, estado inmunológico de los individuos y abundancia de la bacteria en la biopelícula (Chang, C. W., Huang, B. H., Lin, S. M., Huang, C. L., Liao, P. C., 2016). Otros estudios también han demostrado que , la producción de biopelículas (Ringo, E., L., Lovmo, M., Kristiansen, Y., Bakken, I., Salinas, R., Myklebust, R. E., Ólsen, T. M., Mayhew, 2010; Sánchez-Ortíz, A. C., A., Luna Gonzalez, A. I., Campa Cordova, R., Escamilla Montes, M. del C., Flores Miranda, J. M., Mazon Suastegui, 2015) al ser una propiedad que les permite a las bacterias adherirse firmemente a las superficies o a las células vecinas (Flemming, H.-C, J., Wingender, 2010; Soto, G. E., S. J., Hultgren, 1999), las vuelve potencialmente patógenas en reptiles y anfibios, en los cuales tienen comportamiento oportunista y son capaces de tener

como nicho tejidos dañados como resultado de algún trauma o pueden beneficiarse del estado de estrés de los hospederos (Piovia-Scott, J., D., Rejmanek, D. C., Woodhams, S. J., Worth, H., Kenny, V., McKenzie, S. P., Lawler, J. E., Foley, 2017). Estas características de *Acinetobacter*, podrían explicar el desarrollo de las lesiones cutáneas y muerte de los achosques observadas en el experimento de infección controlada de este estudio. Sin embargo, es indispensable identificar molecularmente las 12 cepas aisladas de estos achosques infectados que murieron, para brindar mayor evidencia sobre la patogenicidad de esta cepa, ya que para determinar que un microorganismo es un agente causal de una enfermedad, es necesario el cumplimiento de los cuatro postulados de Koch (Dazcak, P., A. A., Cunningham, A., Hyatt, 2003). Dichos postulados estipulan: 1) el microorganismo debe de estar presente en el animal que presenta la patología, aquí se debe de tomar en cuenta que muchos de los microorganismos considerados patógenos se encuentran de manera natural en el ambiente y formar parte del microbioma de la especie, sin embargo, la determinante de que estos puedan generar daño en el hospedero es que se genere un cambio en la densidad celular. 2) el microorganismo debe de ser aislado del individuo que se encuentra enfermo y determinar si su presencia o aumento en densidad en el hospedero contribuyen al desarrollo de los síntomas de la enfermedad y/o a eventos de mortalidad ; 3) se debe demostrar que el microorganismo aislado del individuo que presenta enfermedad, causa la enfermedad en individuos sanos, por lo que se deduce que el microorganismo inoculado es el origen de la enfermedad; y 4) aislar el microorganismo de los individuos infectados y demostrar que es el microorganismo inoculado inicialmente, para confirmar la patogenicidad del agente infeccioso (Dazcak, P., A. A., Cunningham, A., Hyatt, 2003; Bass, D., G. D., Stendiford, H., C., Wang, B., Kostella, C. R., Tyler, 2019; Chesteron, G. K., 2019).

Finalmente, es importante resaltar que la comunidad científica está en estado de alarma por la disminución asociada a enfermedades en poblaciones de anfibios de todo el mundo, y aunque la conservación *ex situ* ha sido una de las estrategias para llevar a cabo la reproducción de especies de *Ambystoma*, se han presentado

enfermedades originadas por las condiciones como lo son mal manejo de los individuos, mala calidad de agua, alimentación inadecuada, instalaciones ineficientes y el estado de estrés inducido en los individuos (Mena, H., E., Servín, 2014; Walls, S. C., Ball, L. C., Barichivich, W.J., Dodd, C., K., Enge, K., M., Gorman, T. A., O'tdonell, K. M., Palis, J. G., Semlitsch, 2017). Es por ello importante identificar las condiciones apropiadas que permitan el control de enfermedades infecciosas en los organismos mantenidos en cautiverio. Uno de los principales factores es el mantenimiento de la temperatura apropiada para los organismos, evitando así enfermedades infecciosas por patógenos, como bacterias, parásitos y hongos como *Batrachoquiritium dendrobatidis*. La calidad del agua es otro factor importante, ya que, si los sistemas no cuentan con un filtrado adecuado y recambio de agua de manera continua, se pueden acumular sustancias disueltas como desechos nitrogenados, por ejemplo, el amoníaco que es el resultado de la degradación de la urea, o toxinas que son absorbidas por la piel y hace propensos a los organismos a diferentes infecciones (de Vosjoli, P. 1999). De igual manera, una alimentación deficiente, principalmente deficiencia de vitamina A, puede generar metaplasia epitelial, tal como se ha demostrado para otras especies como *Gastrotheca cornuta*, *Hemiphractus fasciatus*, y *Hylomantis lemur* (Pessier, A. P., E. J., Baitchman, P. C., Wilson, E., Griffth, H. Ross, 2014), además de asociarse a la inmunosupresión haciendo a los organismos mantenidos en cautiverio más susceptibles a patógenos (Michaels, C. J., R. E., Antwis, R. F., Preziosi, 2014). La higiene (limpieza, desinfección y/o esterilización) inadecuada expone a las poblaciones de anfibios en cautiverio a un contacto directo con los microorganismos, por lo cual el manejo de los individuos debe de minimizar el riesgo de diseminar patógenos. Por lo anterior, para el control de enfermedades en las poblaciones mantenidas en cautiverio, no sólo es necesario identificar el agente causal de la enfermedad que permita proponer la mejor alternativa de tratamiento del microorganismo, sino realizar un diagnóstico exhaustivo de las condiciones de manejo del sistema en el cual se encuentran los organismos. En este sentido, la evidencia actual indica que una mejor alternativa de conservación *ex situ* de los achosques podría ser establecer unidades de

manejo en sistemas más similares al hábitat original de estos organismos, por ejemplo, en estanques abiertos localizados en las cercanías del área de distribución natural de los organismos. Las condiciones de estas unidades de manejo permitan el desarrollo de los acoques en condiciones más naturales, en las cuales disminuyen los factores estresantes y hacen posible que se establezcan las comunidades microbianas de la piel (microbioma natural), que por un lado reduzcan la posibilidad que un solo patógeno incremente su abundancia y sus efectos patogénicos, y por el otro mejoren la respuesta inmune de los organismos, disminuyendo así la incidencia de patógenos.

8. CONCLUSIONES

- Se lograron aislar un total de 18 cepas bacterianas de la piel de *Ambystoma dumerilii* (lesiones cutáneas) que se encontraban en condiciones de cautiverio en El Centro Regional de Investigación Acuícola y Pesquera de Pátzcuaro (CRIAP).
- Los aislados bacterianos presentaron morfología de bacilos y bacilo-cocos agregados (formación de biopelículas), lo cual facilita su adhesión a la piel de los achoques.
- En la identificación molecular de las cepas bacterianas se encontraron que las cepas pertenecían a los grupos *Pseudomonas*, *Aeromonas* y *Acinetobacter* presentando porcentaje de identidad por arriba del 94%, de las cuales dos especies están reportadas como patógenos potenciales.
- La infección experimental de achoques sanos con una de las cepas aisladas de *Acinetobacter*, resultó en el desarrollo de lesiones cutáneas y la posterior mortalidad de los individuos infectados, lo cual sugiere que esta cepa representa un patógeno del achoque en abundancias altas como la usada en el experimento.
- Se aislaron 12 cepas bacterianas de las lesiones de los achoques infectados que murieron y algunas de las cepas muestran la misma morfología colonial que la cepa usada para la infección.
- La confirmación de la patogenicidad requiere de la identificación molecular de la cepa usada en la infección.

9. BIBLIOGRAFIA

- Aguilar, X., G., Legorreta, y G., Casas-Andreu (2009). Reproducción ex situ en *Ambystoma granulorum* y *Ambystoma lermaense* (amphibian: *Ambystomatidae*) Acta de Zoología mexicana, (25) 3: 443-454.
- Alarcón, T., D'Auria, G., D'Auria, S, Delgado, R Del Campo, M, Ferrer.(2016). Microbiota. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 01-43.
- Alvarado-Díaz, J., I, Suazo-Ortuño, LD, Wilson, O, Medina-Aguilar. (2013). Patterns of physiographic distribution and conservation status of the herpetofauna of Michoacán, México. Amphib. Reptile Conserv. 128-170.
- Antwis, R. E., Haworth, R. L., Engelman, D. J. P., Ogilvy, V., Fidgett, A. L., Preziosi, R. F. (2014). Ex situ Diet Influences the Bacterial Community Associated with the Skin of Red-Eyed Tree Frogs (*Agalychnis calidryas*). Plos one 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085563>
- Antwis, R. E., X.A., Harrison. (2018). Probiotic consortia are not uniformly effective against different amphibian chytrid pathogen isolates. Mol Ecol 27, 577-589.
- Apponyi, M. A., T.L., Pukala, C.S., Brinkworth, V.M., Maselli, J.H., Bowie, M.J., Tyler, G.W., Booker, J.C., Wallace, J. A., Carver, F, Separovic, J., Doyle, L.E., Llewellyn. (2004). Host-defence peptides of Australian anurans: structure, mechanism of action and evolutionary significance. Peptides 25, 1035-1054. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2004.03.006>
- Banning, J. L., A.L., Weddle, G.W., Wahl III, M.A., Simon, A., Lauer, R.L., Walters, R. N., Harris. (2008). Antifungal skin bacteria, embryonic survival, and communal nesting in four-toed salamanders, *Hemidactylium scutatum*. Oecologia 156, 423-429. <https://doi.org/10.1007/s00442-008-1002-5>

- Basanta, M. D. (2019). Ecología y evolución de enfermedades emergentes: Una revisión de ranavirus y quitridiomycosis. *Revista Latinoamericana de Herpetología*, 09-25. <https://doi.org/10.1111/mec.14456>
- Bataile, A., L., Lee-Cruz, B., Tripathi, H., Kim, B., Waldman. (2016). Microbiome Variation Across Amphibian Skin Regions: Implications for Chytridiomycosis Mitigation Efforts. *Micro Ecol* 71, 221-232. <https://doi.org/10.1007/s00248-015-0653-0>
- Bass, D., Stentiford, G. D., Wang, H. C., Koskella, B., Tyler, C. R. (2019). The Pathobiome in Animal and Plant Diseases. *Trends in Ecology & evolution*, 996-1008. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2019.07.012>
- Bates, K. A., J.M.G., Shelton, V.L., Mercier, K.P., Hopkins, X.A., Harrison, S.O., Petrovan, M.C., Fisher, M. C. (2019). Captivity and Infection by the Fungal Pathogen *Batrachochytrium salamandrivorans* Perturb the Amphibian Skin Microbiome. *Front. Microbiol.* 10, 1834, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01834>
- Becker, M. H., C.L., Richards-Zawacki, B., Gratwicke, L.K., Belen, L. K. (2014). The effect of captivity on the cutaneous bacterial community of the critically endangered Panamanian Golden frog (*Atelopus zeteki*). *Biological Conservation* 176, 199-206. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.05.029>
- Berger, L., A., Hyatt, R., Speare, J., Longcore, J. (2005). Life cycle stages of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Dis. Aquar. Org.*, 68, 51-63. <https://doi.org/10.3354/dao068051>
- Berry, J. P., E., Lee, K., Walton, A.E., Wilson, F., Bernal-Brooks, F. (2011). Bioaccumulation of microcystins by fish associated with a persistent cyanobacterial Bloom in Lago de Patzcuaro (Michoacan, Mexico). *Environmental Toxicology*, 1621-1628. <https://doi.org/10.1002/etc.548>

- Blaustein, A. R., B.A, Han, R.A., Relyea, P.T.J., Johnson, J.C, Buck, S. S., Gervasi, L.B., Kats. (2011). The complexity of amphibian population declines: understanding the rola of cofactors in driving amphibian losses. ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES, 108-119. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05909.x>
- Bocanegra, P. (2013). Caracterización fenotípica y molecular de aislamientos clínicos de *Acinetobacter baumannii* obtenidos en un hospital de tercer nivel de Nuevo León. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, N. L., 87 pp.
- Bosch, J. (2003) Nuevas amenazas para los anfibios: enfermedades emergentes. Munibe. 16: 56-73.
- Bou, G., A., Fernández, C., García, J.A., Sáez-Nieto, S., Valdezate. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. ELSERVIER, 601-608. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>
- Bresciano, J. T., C.A., Salvador, C., Paz-Miño, A.M., Parody-Merino, J., Bosh, D.C., Woodhams, D. C. (2015). Variation in the Presence of Anti-*Batrachochytrium dendrobatidis* Bacteria of Amphibians Across Life Stages and Elevations in Ecuador. EcoHealth 12, 310-319. <https://doi.org/10.1007/s10393-015-1010-y>
- Brito de Assis, A., C., dos Santos, F.P., Dutra, A., de Oliveira Motta, F.S., Costa, C.A., Navas, B.S., Magalhaes, C.C., Barreto. (2016). Assessing Antibacterial Potential of Components of *Phyllomedusa distinta* Skin and its Associated Dermal Microbiota. J Chem Ecol 42, 139-148. <https://doi.org/10.1007/s10886-016-0665-3>
- Brunetti, A. E., M.L., Lyra, W.G.P., Mielo, L.E., Andrade, P., Palacios-Rodríguez, B.M., Prado, C.F.B., Haddad, M.T., Pupo, N.P., Lopes. (2018). Symbiotic skin bacteria as a source for sex-specific scents in frogs. Proc Natl Acad Sci USA 116, 2124-2129. <https://doi.org/10.1073/pnas.1806834116>

- Cárdenas-Perea, M e., O.R., Cruz y López, J.L., Gándara-Ramírez, M.A., Pérez-Hernández. (2014). Factores de virulencia bacteriana: la inteligencia de las bacterias. *Elementos* 94, 35-43.
- Castro, A. M. (2014) *Bacteriología médica basada en problemas*. 2ª Edición. El Manual Moderno México, D. F., pp 561.
- Chambouvet, A., V., Smilansky, M., Jirkú, M., Isidoro-Ayza, S., Itoïs, E., Derelle, A., Monier, D.J., Gower, M., Wilkinson, M.J., Yabsley, J., Lukes, T.A., Richards, T. A. (2020). Diverse alveolate infections of tadpoles, a new threat to frogs?. *PLOS Pathogens*, 1-7. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008107>
- Chang, C. W., B.H., Huang, S.M., Lin, C.L., Huang, P.C., Liao. (2016). Changes of diet and dominant intestinal microbes in farmland frogs. *BMC Microbiology*, 1-13. DOI 10.1186/s12866-016-0660-4
- Chesterton, G. K. (2019). Changing how we think about infectious diseases. *ELSEVIER*. 321-365. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817576-7.00008-0>
- Cordero. A., A., Ramírez, S., Martínez, P.O., Aguilar. (2021). *Ambystoma* un fascinante genero de anfibios en México. *Revista de Educación en Ciencias e Ingeniería*, 5-18.
- Cortés, I L. (2015). *Diversidad Genética, Genes de Virulencia y Estructuras de Superficie Implicadas en la Patogenicidad de Géneros Aeromonas*. Tesis de Doctorado. Universidad de Barcelona. 155pp.
- Daszak, P., A.A, Cunningham, A., Hyatt. (2003). Infectious disease and amphibian population declines. *Diversity Distributions* 9, 141-150. <http://www.blackwellpublishing.com/journals/ddi>
- De Vosjoli, P. (1999). Designing environments for captive amphibians and reptiles. *Veterinary Clinics of North America Exotic Animal Practice*, 2 (1), 43-68. [https://doi.org/10.1016/S1094-9194\(17\)30139-1](https://doi.org/10.1016/S1094-9194(17)30139-1)

- Del Valle, J.M., H.L., Eisthen. (2019). Treatment of Chytridiomycosis in Laboratory Axolotls (*Ambystoma mexicanum*) and Rough-skinned Newts (*Taricha granulosa*). *Comparative Medicine*. DOI: 10.30802/AALAS-CM-18-000090
- Densmore, C., D., Earl. (2007). Diseases of Amphibians. *Academic* 48, 235-253. <https://academic.oup.com/ilarjournal/article/48/3/235/663549> by guest on 05 August 2021
- Demircan, T., G., Ovezmyradov, B., Yildirim, I., Keskin, A.E., Ilhan, E.C., Fescioglu, G., Öztürk, S., Yildirim. (2018). Experimentally induced metamorphosis in highly regenerative axolotl (*Ambystoma mexicanum*) under constant diet restructures microbiota. *Sci Rep* 8, 10974. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29373-y>
- Dias, C., A., Borges, M.J., Saavedra, M., Simoes, M. (2018). Biofilm formation and multidrug-resistant *Aeromonas* spp. From wild animals. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 12, 227-234. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.09.010>
- Drancourt, M., P., Berger, D., Raoult. (2004). Systematic 16S rRNA Gene Sequencing of Atypical Clinical Isolates Identified 27 New Bacterial Species Associated with Humans. *Journal of Clinical Microbiology* 42, 2197-2202. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.5.2197-2202.2004>
- Flechas, S. V., C., Sarmiento, M.E., Cárdenas, E.M., Medina, S., Restrepo, A., Amézquita. (2012). Surviving Chytridiomycosis: Differential Anti-*Batrachochytrium dendrobatidis* Activity in Bacterial Isolates from Three Lowland Species of *Atelopus*. *PLOS ONE* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044832>
- Garcia, L., P., Burrowes, M., Dominguez-Bello. (2019). The Skin Microbiota of *Elutherodactylus* Frogs: Effects of Host Ecology, Phylogeny, and Local Environment. *Frontiers in Microbiology*. 1-14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02571>

- Gray, M., D., Miller, J., Hoverman. (2009). Ecology and pathology of amphibian ranaviruses. *Dis. Aquat. Org.*87, 243-266. <https://doi.org/10.3354/dao02138>
- Guzman, X. (2020). Características del microbiota cultivable de la piel de *mAbystoma ordinarum* en cautiverio. Tesis de Maestría. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia Michoacán. 86 pp.
- Flechas, S. V., A., Blasco-Zúñiga, A., Merino-Viteri, V., Ramírez-Castañeda, M., Rivera, A., Amézquita. (2017). The effect of captivity on the skin microbial symbionts in three *Atelopus* species from the lowlands of Colombia and Ecuador. *PeerJ* 5, e3594. <https://doi.org/10.7717/peerj.3594>
- Flemming, H.-C., J., Wingender. (2010) The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* 8, 623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
- Franca, F.M., D. de C., Dias, P.C., Teixeira, A.S., Marcantonio, M.V.D., Stéfani, A., Antonucci. (2008). Efeito probiótico *Bacillus subtilis* no crescimento, sobrevivência e fisiologías de rás-touro (*Rana catesbeiana*). *Pesca Sao Paulo* 34, 403-412.
- Freitas, J. J. G., P., Viau, C.A., Oliviera, P.C., Teixeira, L., Tachibana, D., de Carla, Dias, M., Hipolito, I.C.C., Bordon, S.R., Alfaia, C.M., Ferreira. (2017). Effect of dietary supplements in American Bullfrogs reared in low and high stocking densities. *Aquaculture Reports* 8, 45-48. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2017.09.003>
- Harris, R.N., T.Y., James, A., Lauer, M.A., Simon, A., Patel. (2006). Amphibian Pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* Is Inhibited by the Cutaneous Bacteria of Amphibian Species. *EcoHealth* 3, 53-56. <https://doi.org/10.1007/s10393-005-0009-1>
- Hernández-Gómez, O., J.T., Briggler, R.N., Williams. (2019). Captivity-Induced Changes in the Skin Microbial Communities of Hellbenders (*Cryptobranchus*

alleganiensis). *Microb Ecol* 77, 782-793. <https://doi.org/10.1007/s00248-018-1258-1>

Huacuz, D. C. (2008). Biología y conservación del género *Ambystoma*, en Michoacán, México. Tesis de Doctorado. Universidad de Salamanca. Salamanca. 378 pp

Huacuz, D. C. (2012). Manual para el manejo *ex situ* de Achoques. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales. 83 pp.

Jani, A.J., C.J., Briggs (2014). The pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* disturbs the frog skin microbiome during a natural epidemic and experimental infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 111, E5049–E5058. <https://doi.org/10.1073/pnas.1412752111>

Kast, J., N., Hanna. (2008). Higiene y Control de Enfermedades: en Campo y en Cautiverio, en Poole, V. A., & Grow S. Guía para el Manejo de Anfibios en Cautiverio, AZCARM. http://www.aza.org/ConScience/Amphibians_Intro/

Khalifa, A. Y. Z., G., Bekhet. (2018). First isolation and characterization of the pathogenic *Aeromonas veronii* *bv. veronii* associated with ulcerative síndrome in the indigenous *Pelophylax ridibundus* of Al-Ahsaa, Saudi Arabia. *ELSERVIER*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2017.10.019>

Kueneman, J. G., D.C., Woodhams, R., Harris, H.M., Archer, R., Knight, V.J., McKenzie. (2016). Probiotic treatment restores protection against lethal fungal infection lost during amphibian captivity. *Proc. R., Soc. B* 283, 20161553. <https://doi.org/10.1098/rspb.2016.1553>

Knutie S. A., L.A., Shea, M., Kupselaitis, C.L., Wilkinson, K.D., Kohl, J.R., Rohr. (2017). Early-Life Diet Affects Host Microbiota and Later-Life Defenses Against Parasites in Frogs. *Integr Comp Biol.* 731-742. Doi: 10.1093/icb/ix028

- Lauer, A., M.A., Simon, J.L., Banning, E., André, K., Duncan, R.N., Harris. (2007). Common Cutaneous Bacteria from the Eastern Red-Backed Salamander Can Inhibit Pathogenic Fungi. *Copeia* 2007, 630-640. [https://doi.org/10.1643/0045-8511\(2007\)2007\[630:CCBFTE\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1643/0045-8511(2007)2007[630:CCBFTE]2.0.CO;2)
- Lauer, A., M.A., Simon, J.L., Banning, B.A., Lam, R.N., Harris. (2008). Diversity of cutaneous bacteria with antifungal activity isolated from female four-toed salamanders. *OSME J2*, 145-157. <https://doi.org/10.1038/ismej.2007.110>
- Loudon, A. H., D.C., Woodhams, L.W., Parfrey, H., Archer, R., Knight, V., Mckenzie, R.N., Harris. (2014). Microbial community dynamics and effect of environmental microbial reservoirs on red-backed salamanders (*Plethodon cinereus*). *ISME J* 8, 830-840. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.200>
- Madigan, M., J., Martinko, J., Parker. (2004). *Biología de los microorganismos. International Microbiology*, 77-80.
- March, J. C., W.E., Bentley. (2004). Quorum sensing and bacterial cross-talk in biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology* 15, 495-502. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2004.08.013>
- Martel, A., A., Spitzen-van der Sluijs, M., Blooi, W., Bert, R., Ducatelle, R., Fisher, A., Wowlitjes, W., Bosman K., Chiers, F., Bossuyt, F., Pasmans. (2013)., *Batrachochytrium salamandrivorans* sp. Nov. Causes lethal chytridiomycosis in amphibians. *Proceedings of the National Academy of Science* 110, 15325-15329. <https://doi.org/10.1073/pnas.1307356110>
- Mena, H. y E. Servin, (2014) *Manual básico para el cuidado en cautiverio del axolote de Xochimilco (Ambystoma mexicanum)* Primera Edición Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 37pp.

- Michaels CJ, R.E., Antwis, R. F., Preziosi. (2014) Impact of plant cover on fitness and behavioural traits of captive Red-eyed tree frogs (*Agalychnis callidryas*). PLoS ONE 9:e95207. doi:10.1371/journal.pone.0095207
- Mignard, S., J.P., Flandrois. (2006). 16S rRNA sequencing in routine bacterial identification: a 30-month experiment. Journal of microbiological methods, 574-581. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.05.009>
- Myers, J. M., J.P., Ramsey, A.L., Blackman, A. E., Nichols, K.P.C., Minbiole, R.N., Harris. (2012). Synergistic Inhibition of the Lethal Fungal Pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*: The Combined Effect of Symbiotic Bacterial Metabolites and Antimicrobial Peptides of the Frog *Rana mucosa*. J Chem Ecol 38, 958-965. <https://doi.org/10.1007/s10886-012-0170-2>
- Nichols, D. K., E.W., Lamirande, A.P., Pessier, J.E., Longcore. (2001). Experimental transmission of cutaneous chytridiomycosis in dendrobatid frogs. Journal of Wildlife Diseases 37, 1-11. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-37.1.1>
- Nya, E. J., B., Austin, B. (2009). Use of dietary ginger, *Zingiber officinale* Roscoe, as an immunostimulant to control *Aeromonas hydrophila* infections in rainbow, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Journal of Fish Diseases, 971-977. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2009.01101.x>
- O'Toole, G., H.B., Kaplan, R., Kolter. (2000). Biofilm Formation as Microbial Development. Annu. Rev. Microbiol. 54, 49-79. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.49>
- Pachon, D. (2009). Aislamiento, identificación y serotipificación de enterobacterias del género *Salmonella* en una población de *Crocodylus intermedius* y testudinos mantenidos en cautiverio en la estación de biología tropical Roberto Franco E.B.T.R.B. de la Facultad de Ciencias. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. 115 pp.

- Pacher, C.N., E.D., Perez. (2016). Caracterización del cuadro clínico, Leucograma diferencial y hallazgos de necropsia en esturiones siberianos (*Acipenser baerii*) infectados experimentalmente con *Aeromonas hydrophila* (Bacteria: Aeromonadaceae). Tesis de Doctorado. Universidad de la Republica. Montevideo, Uruguay. 27 pp.
- Parra-Olea, G., O., Flores-Villela, C., Mendoza-Almeralla (2014). Biodiversidad de anfibios en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 85: 460-466.
- Passos, L. f., G., García, R.J., Young. (2018). Comparing the bacterial communities of wild and captive Golden mantella frogs: Implications for amphibian conservation. *PLOS ONE* 13, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205652>
- Piovia-Scott, J., D., Rejmanek, D. C., Woodhamns, S.J., Worth, H., Kenny, V., McKenzie, S.P., Lawler, J.E., Foley (2017). Greater Species Richness of Bacterial Skin Symbionts Better Suppresses the Amphibian Fungal Pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Microb Ecol* 74, 217-226. <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0916-4>
- Pereira, C. N., I., Di Rosa, A., Fagotti, F., Simoncelli, R., Pascoleni, L., Mendoza (2005). The Pathogen of Frogs *Amphibocystidium ranae* Is a Member of the Order Dermocystida in the Class Mesomycetozoea. *Journal of Clinical Microbiology* 43, 192-198. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.1.192-198.2005>
- Pessier, A. P. (2002). An Overview of Amphibians Skin Disease. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* 11, 162-174.
- Pessier, A. P., E.J., Baitchman, P., Crupm, B., Wilson, E., Griffith, H., Ross (2014). Causes of mortality in anuran amphibians from an *ex situ* survival assurance colony in Panama. *Zoo Biology* 33, 516-526. <https://doi.org/10.1002/zoo.21166>

- Pintos, C. N., E.D., Perez (2016). Caracterización del cuadro clínico, Leucograma deferencial y hallazgos de necropsia en esturiones siberianos (*Acipenser baerii*) infectados experimentalmente con *Aeromonas hydrophila* (Bacteria: Aeromonadaceae). Tesis de Doctorado. Universidad de la Republica Facultad de veterinaria. Montevideo, Uruguay. 27pp
- Rasmussen-Ivey, C. R., M.L., Figueras, D., McGarey, M.R., Liles (2016). Virulence Factors of *Aeromonas hydrophila*: In the Wake of Reclassification. *Front. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01337>
- Ringo, E., L., Lovmo, M., Kristiansen, Y., Bakken, I., Salinas, R., Myklebust, R.E., Olsen, T.M., Mayhew (2010). Lactic acid bacteria vs pathogens in the gastrointestinal tract of fish: a review. *Aquaculture Research* 41, 451-467. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02339.x>
- Rivas, Z. P. (2016). *Aeromonas hydrophila* In Amphibians: Harmless Bystander or Opportunistic Pathogen. University of Central Florida. 1-46. <https://stars.library.ucf.edu/honorsthesis/13>
- Rodríguez, M., E., Botero, C.A., Iregui, J., Figueroa (2005). Extracción de productos extracelulares de *Aeromonas hydrophila* y sus efectos en la tilapia roja (*Oreochromis spp.* y cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). *Acta Biológica Colombiana* 10, 75-93.
- Sabino-Pinto, J., M.C., Bletz, M. M., Islam, N., Shimizu, S., Bhujra, R., Geffers, M., Jarek, A., Kurabayashi, M., Vences (2016). Composition of the Cutaneous Bacterial Community in Japanese Amphibians: Effects of Captivity, Host Species, and Body Region. *Microb Eco* 72, 460-469. <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0797-6>
- Sánchez, D. (2017). Dimorfismo sexual en *Ambystoma rivulare* (Caudata: Ambystomatidae). Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca, estado de México. 39 pp.

- Sánchez Ortíz, A. C., A., Luna Gonzalez, A.I., Campa Cordova, R., Escamilla Montes, M del C., Flores Miranda, J.M., Mazon Suastegui (2015). Isolation and characterization of potential probiotic bacteria from pustulose ark (*Anadara tuberculosa*) suitable for shrimp farming. *Lajar* 43, 123-136. <https://doi.org/10.3856/vol43-issue1-fulltext-11>
- Servín, E. (2011). Manual de mantenimiento en cautiverio y medicina veterinaria aplicada al ajolote de Xoxhimilco (*Ambystoma mexicanum*) en el Zoológico de Chapultepec. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Servín, E. (2017) Formato Adaptado de AARK “Ex situ Management Guidelines” por el Grupo de Anfibios de Comité de Conservación de la ALPZA Pautas de Manejo Ex situ: *Ambystoma dumerilii*.
- Shapiro, J. A. (1998). Thinking about bacterial populations as multicellular organisms. *Annu. Rev. Microbiol.* 52, 81-104. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.52.1.81>
- Soto, C. (2012). Uso y selección del microhábitat de la salamandra de montaña *Ambystoma ordinarium*. Tesis de Maestría. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán. 63 pp.
- Soto, G.E., S.J., Hultgren (1999). Bacterial Adhesins: Common Themes and Variations in Architecture and Assembly. *J. Bacteriol.* 181, 1059–1071. <https://doi.org/10.1128/JB.181.4.1059-1071.1999>
- Stuart, S., J.C., Chanson, B., Young, A., Rodrigues, D., Fischman & R., Waller (2004). Status and Trends of Amphibian Declines and Extinctions Worldwide. *Science*, 1783-1786.
- Tibatá, V. M. (2016). Detección de patógenos causantes de enfermedades de impacto en apicultura y determinación de los mitotipos de africanización en

tres regiones de Colombia. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. 315 pp.

Vásquez, M. A., I.S., Rondón. L.F., Restrepo, P.R., Eslava (2010). Estudio clínico y hematológico de una infección experimental con *Aeromonas hydrophila* y *Edwardsiella tarda* en tilapia, *Oreochromis* sp. Orinoquia, 14(1), 33-44.

Velarde, T. (2011). Importancia ecológica y cultura de una especie endémica de Ajolote (*Ambystoma dumerilii*) del Lago de Pátzcuaro, Michoacán. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 100 pp.

Wake, D. y V. Vredenburg, (2008). Are we in midst of the sixth mass extinction? A view from the worl of amphibians Proceedings' of the National Academy Sciences 105, 11466-11473

Walke, J.B., M.H., Becker, S.C., Loftus, L.L., House, T.L., Teotonio, K.P.C., Minbiole, L.K., Belden (2015b). Community Structure and Function of Amphibian Skin Microbes: An Experiment with Bullfrogs Exposed to a Chytrid Fungus. PLoS ONE 10, e0139848. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139848>

Walls, S. C., L., Ball., W.J., Barichivich, C.K., Dodd, J.K.M., Enge, T.A., Gorman, K.M., O'donnell, J.G., Palis, R.D., Semlitsch (2017). Overcoming Challenges to the Recovery of Declining Amphibian Populations in the United States. BioScience 67, 156-165. doi:10.1093/biosci/biw153

Wendel, E., A., Yaparla, D.V., Koubourli, L., Grayfer (2017). Amphibians (*Xenopus laevis*) tadpoles and adult frogs mount distinct interferón responses to the Frog Virus 3 ranavirus. ELSEVIER, 12-20. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.01.001>

- Whitfield, S. M., K.R., Lips, M.A., Donnelly (2016). Amphibian Decline and Conservation in central America. American Society of Ichthyologists and Herpetologists, 351-379.
- Woodhams, D. C., K., Ardiprdja, R.A., Alford, G., Marantelli, L.K., Reinert, L.A., Rollins. Smith (2007). Resistance to chytridiomycosis varies among amphibian species and is correlated with skin peptide defenses. *Animal Conservation* 10, 409-417. <https://doi.org/10.1111/j.1469-1795.2007.00130.x>
- Woodhams D. C., V.T., Vredenburg, M.A., Simon, D., Billheimer, B., Shakhtour, Y., Shyr, C.J., Briggs, L.A., Rollins-Smith, R.N., Harris (2007). Symbiotic bacteria contribute to innate immune defenses of the threatened mountain yellow-legged frog. *Rana mucosa*. *Biological Conservation* 138, 390-398. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2007.05.004>
- Woodhams, D. C., H., Brandt, S., Baumgartner, J., Kielgast, E., Küpfer, U., Tobler, L.R., Davis, B.R., Schmidt, C., Bel. S., Holdel, R., Knight, V., McKenzie (2014). Interacting Symbionts and Immunity in the Amphibian Skin Mucosome Predict Disease Risk and Probiotic Effectiveness. *PLOS ONE* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096375>
- Woodhams, D. C., R.A., Alford, R.E, Antwis, H., Archer, M.H., Becker, L.K., Belden, S.C., Bell, J.H., Bletz, M., Daskin, L.R., Davis, S.V., Flechas, A., Lauer, A., Gonzalez, R.N., Harris, W.M., Holden, M.C., Hughey, R., Ibáñez, R., Knight, J., Kueneman, F., Rabemananjara, L.K., Reinert, L. A., Rollins-Smith, F., Roman-Rodríguez, S.D., Shaw, J.B., Walke, V., McKenzie (2015). Antifungal isolates databases of amphibian skin-associated bacteria and function against emerging fungal pathogens: Ecological Archives E096-059. *Ecology* 96, 595-595. <https://doi.org/10.1890/14-1837.1>

Worthylake, K. M., P., Hovingh (1989). Mass mortality of salamanders (*Ambystoma tigrum*) by bacteria (*Acinetobacter*) in an oligotrophic seepage mountain lake. Great Basin Naturalist. 364-372.
<https://scholarsarchive.byu.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=3031&context=gbn>