



Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
Instituto de Investigaciones sobre los Recursos
Naturales



Características de la microbiota cultivable de la piel de *Ambystoma ordinarium* en cautiverio



Presentado por:

Biol. Xochitl Guzmán Hernández

Como requisito para obtener el título profesional de

Posgrado en Maestría en Ciencias en Ecología Integrativa

Tutor de Tesis:

Dra. Yurixhi Maldonado López

Co-Tutor:

Dra. Yunuen Tapia Torres

Morelia, Michoacán, Noviembre del 2020

A mi familia por su apoyo incondicional

Gracias

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiómica, de la ENES Morelia y el Laboratorio de Herpetología y Ecología Animal del Instituto de Ecología sobre los Recursos Naturales UMSNH.

Agradecemos las facilidades prestadas por el Laboratorio de Biología Molecular y Ecología Genética, ENES Morelia y el Laboratorio de Biología de Sistemas y Biología Sintética, del Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM.

Este trabajo formó parte del proyecto PAPIIT-UNAM-DGAPA (IA206219) "Uso sostenible de los fertilizantes fosfatados como mecanismo para el mantenimiento a largo plazo de la fertilidad de suelos".

Agradezco al Instituto de Investigaciones sobre los Recursos Naturales, de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (INIRENA) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH) y al Posgrado en Ciencias en Ecología Integrativa (MCEI) por las facilidades otorgadas para la realización del presente trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo económico durante los cuatro periodos escolares.

A mi asesora de tesis la Dra. Yurixhi Maldonado López por darme la oportunidad de trabajar en este proyecto, por su enorme apoyo en la realización de este trabajo, sus consejos y principalmente su paciencia. Gracias.

A mi co-asesora la Dra. Yunuen por sus valiosos aportes y consejos que me permitieron mejorar en gran manera el presente trabajo. Gracias.

A la Dra. Ireri Suazo Ortuño por su orientación en el desarrollo de este trabajo. Gracias.

A la Dra. Ana María González Di Pierro por su amabilidad y accesibilidad dentro y fuera de la universidad. Gracias.

A la Dra. Eria Rebollar Caudillo, no sólo por los importantes aportes y consejos para la realización del trabajo sino por la enorme paciencia y apoyo para llevar a un buen término el presente trabajo. Gracias.

Al Biól. David Tafolla por siempre estar ahí, por brindarnos su laboratorio para el procesamiento de las muestras. Gracias.

A la Dra. Nancy Calderón Cortés, por su amabilidad, por permitirme usar el

laboratorio.

A la Dra. Rocio Hernández León, al Dr. Jesus Clanderal Mendoza, y a Brenda Amaira Baca Patiño por su apoyo, comentarios y sugerencias en el laboratorio. Gracias

A Saúl González, por apoyarme con todas las dudas sobre trámites en todo momento. Gracias.

A Javier Moreno por su apoyo dentro del laboratorio de Metagenómica. Gracias.

A mis amigos y compañeros Marcos, David, Angy, Ricardo, Kareen, Amy, Will, Eddy, Male, Luis, por el apoyo tanto moral como académico. Gracias.

A Pedro por aguantar mi hermoso genio. Gracias

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
I. INTRODUCCIÓN	4
I.I Microbiota de la piel de los anfibios	5
I.II Microbiota de la piel de los anfibios en cautiverio	9
I.III Microbiota de la piel de los anfibios inhibidora del crecimiento de patógenos	11
I.IV Capacidad de formación de biopelículas y swarming	14
I.V Identificación taxonómica de bacterias	16
I.VI <i>Ambystoma ordinarium</i>	19
III. JUSTIFICACIÓN	21
III. OBJETIVO GENERAL	22
III. I Objetivos particulares	23
IV. HIPÓTESIS	23
V. MATERIALES Y MÉTODOS	23
V.I Sistema de estudio	23
V. II Toma de muestras	24
V.III Cultivo de muestras	25
V.IV Análisis estadísticos	26
V.V Aislamiento y purificación de colonias	26
V.VI Tinción de Gram	27
V.VII Extracción de ADN	28
V.VIII Amplificación y secuenciación de ADN	29
V.IX Filogenia	30
V.X Swarming y biopelículas	30
VI. RESULTADOS	31
VI. I Descripción morfológica de colonias bacterianas	31
VI. II Identificación taxonómica de bacterias	37
VI. III Tinción de Gram	39
VI. IV Biopelículas y movilidad por swarming.	41
VI.V Relaciones Filogenéticas	47
VII. DISCUSIÓN	50

VIII. CONCLUSIÓN	57
IX. BIBLIOGRAFÍA	57
X. ANEXO	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Área cubierta por colonia en los 3 medios de cultivo utilizados, mostrando el porcentaje de error en cada columna. Las letras diferentes indican las medidas que son significativamente diferentes entre las áreas de las colonias de acuerdo con la prueba LSM	32
Figura 2 Comparación del área cubierta por colonias con distintos colores en los tres medios de cultivos utilizados. Las letras diferentes indican las medidas que son significativamente diferentes entre los colores de las colonias de acuerdo con la prueba LSM.	33
Figura 3 Área cubierta por colonias con distintas elevaciones en los tres medios de cultivos utilizados. Las letras diferentes indican las medidas que son significativamente diferentes entre los colores de las colonias de acuerdo con la prueba LSM.	34
Figura 4 Comparación del área cubierta por colonias con distintas formas de crecimiento en los tres medios de cultivos utilizados. Las letras diferentes indican las medidas que son significativamente diferentes entre los colores de las colonias de acuerdo con la prueba LSM.	35
Figura 5 Comparación del área cubierta por colonias con distintos tipos de borde en los tres medios de cultivos utilizados. Las letras diferentes indican las medidas que son significativamente diferentes entre los colores de las colonias de acuerdo con la prueba LSM.	36
Figura 6 Árbol bayesiano de las bacterias aisladas de la piel de <i>A. ordinarium</i> en cautiverio. Los números representan los OTUS de la piel de <i>A. ordinarium</i> en cautiverio: <i>Bacillus wiedmannii</i> (1033, 1034, 1137, 515), <i>Bacillaceae</i> (511), <i>Bacillus sp.</i> (512, 1138, 514, 911, 111, 811, 9327, 101, 1134, 423, 637, 925, 222, 224, 434, 711, 211), <i>Bacillus flexus</i> (517), <i>Bacillus thuringiensis</i> (1331), <i>Bacillus cereus</i> (912), <i>Bacillus subtilis</i> (1133), <i>Bacillus nakamurai</i> (1223), <i>Bacillus licheniformis</i> (1111, 1211, 9312), <i>Sphingomonas sp.</i> (612) <i>Morganella sp.</i> (737), Enterobacteriaceae (63, 639) <i>Lysinibacillus sp.</i> (518), Sin clasificar (519), <i>Staphylococcus epidermidis</i> (132, 3310), <i>Staphylococcus vitinius</i> (725), <i>Acidovorax sp.</i> (1112), <i>Pseudomonas sp.</i> (823, 135), <i>Pseudomonas alcaligenes</i> (316), <i>Pseudomonas stutzeri</i> (326, 327), <i>Hafnia alvei</i> (421, 624, 625), <i>Hafnia sp.</i> (623, 611, 6310, 638), <i>Enterobacter hormaechei</i> (422), <i>C. freundii</i> (712), <i>Rhizobium sp.</i> (1113), <i>Novosphingobium sp.</i> (312), <i>Microbacterium sp.</i> (1239). El número AY099167 es una especie del género <i>Pyrococcus</i> que fue usada	

como grupo externo y el resto son secuencias tomadas de la base de Woodhams et al., (2015). La tinción de Gram se encuentra representada por un círculo vacío cuando es negativa y relleno cuando es positiva, la estrella y los cuadros vacíos son falta de formación de biopelícula o swarming dependiendo sea el caso. **49**

ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen 1 Orta A. H. (2020). Factores bióticos y abióticos que modulan la estructura y función del microbioma de la piel de los anfibios. Tomado de https://doi.org/10.1655/0018-0831-76.2.167	7
Imagen 2 Ejemplar de <i>A. ordinarium</i> del Laboratorio de Herpetología del Instituto de Investigaciones sobre Recursos Naturales, UMSNH	24
Imagen 3 Colores, formas, y texturas encontradas en los diferentes medios	36

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Ejemplo de algunas bacterias con la capacidad para inhibir el crecimiento del hongo <i>Bd</i>	12
Tabla 2 Identificación taxonómica de bacterias asociadas a <i>A. ordinarium</i> . Se muestra el número de identificación y número de accesión identificado	37
Tabla 3 Características de las bacterias aisladas de la piel de <i>A. ordinarium</i> con la tinción de Gram.	39
Tabla 4 Movilidad por swarming de las bacterias cultivables de la piel de <i>A. ordinarium</i>	43

RESUMEN

Se ha reconocido que la comunidad microbiana de la piel de los anfibios es una parte importante de la defensa contra los patógenos causantes de enfermedades emergentes. Uno de los anfibios mexicanos que se encuentra en peligro de extinción es *Ambystoma ordinarium*, una especie microendémica del estado de Michoacán y el Estado de México. La presente investigación consistió en caracterizar la microbiota cultivable de la piel de *A. ordinarium* en cautiverio. Se tomaron muestras de 13 individuos y se obtuvieron 106 aislados bacterianos puros a partir de pases sucesivos en tres medios de cultivo basales. Se describió la morfología, la movilidad por swarming y se identificaron por métodos moleculares 56 de los aislados de *A. ordinarium*. Los resultados se correlacionaron con la capacidad de producción de biopelículas realizadas por colaboradoras del Centro de Ciencias Genómicas UNAM. Nuestros resultados muestran que las bacterias aisladas e identificadas pertenecen a 10 géneros, *Acidovorax*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Morganella*, *Novosphingobium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* y *Sphingomonas*. En diversos estudios se ha documentado que los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* tienen la capacidad de proteger a los anfibios contra enfermedades emergentes. Quince cepas presentaron movilidad por swarming, y estos resultados sugieren que la microbiota cultivable de *A. ordinarium* en cautiverio, presenta características de gran importancia biológica, ya que le permite a las bacterias colonizar nuevos espacios y posiblemente proveer protección contra patógenos.

Palabras clave

Ambystoma, bacterias cultivables, cautiverio, biopelículas, defensa, patógenos, swarming.

ABSTRACT

The skin bacterial community of amphibians has been recognized as an important part of their defense against emerging diseases. One of the Mexican amphibians that is in danger of extinction is *Ambystoma ordinarium*, a microendemic species to the states of Michoacán and the state of Mexico. The present investigation characterized the cultivable skin microbiota of *A. ordinarium* in captivity. Samples were taken from 13 individuals and 106 pure isolates were obtained from successive passages in three basal culture media. Morphology and swarming capacity were described, and 56 isolates of *A. ordinarium* were taxonomically identified by molecular methods. The results were correlated with the biofilm production capacity carried out by collaborators at the Center for Genomic Sciences, UNAM. Our results show that the isolated bacteria belong to 10 genera, *Acidovorax*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Morganella*, *Novosphingobium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* and *Sphingomonas*. The *Bacillus* and *Pseudomonas* genera have been documented in various studies to have the ability to protect amphibians against emerging diseases. Fifteen strains showed swarming motility, and these results suggest that the cultivable microbiota of *A. ordinarium* in captivity presents important biological characteristics, since it allows bacteria to colonize new spaces and perhaps provide protection against pathogens.

Keywords

Ambystoma, captivity, biofilm, defending, cultivable bacteria, pathogens, swarming.

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el 41% de especies de anfibios se encuentra en peligro de extinción (Stuart et al., 2004, Pimm et al., 2014, IUCN, 2020) debido a diversos factores antropogénicos que actúan sinérgicamente causando la disminución de sus poblaciones (Parra-Olea et al., 2012, Wanger et al., 2010). Algunos factores a los que se les atribuye esta disminución son la contaminación ambiental por productos químicos como los fertilizantes y las aguas residuales, que en conjunto favorece el desarrollo de malformaciones, disminuyen la masa corporal (Gibbons et al., 2000, Parra-Olea et al., 2011, Soto-Rojas et al., 2017) e inducen el estrés oxidativo (Constantini et al., 2010), afectando la sobrevivencia de las especies (Egea-Serrano et al., 2012, Hughey, 2016). Otra de las causas de la disminución de los anfibios es la radiación UV, que afecta el desarrollo embrionario dando como resultado una baja sobrevivencia (Marco, 2003). Otro elemento que limita el crecimiento poblacional de los anfibios es la introducción de especies no nativas como es el caso de los peces y anfibios como el género *Bufo* (Knapp et al., 2007, revisado en Kats y Ferrer, 2003). Aunado a esto, el cambio climático ha favorecido el progreso de las enfermedades emergentes (Pounds et al., 2006), de gran relevancia en la actualidad, debido a que son responsables de la pérdida o disminución de grandes poblaciones de anfibios a nivel mundial (Heard et al., 2013). Entre las enfermedades emergentes de mayor relevancia, se encuentra la enfermedad de la pata roja causada por la bacteria *A. hydrophila*, que ocasiona hemorragias internas en las extremidades, y ha sido reportada en especies como *Alytes obstetricans* (Bosch, 2003).

Otras de las enfermedades emergentes son las causadas por hongos como

Mariannaea elegans, *Rhizomucor variabilis* (Lauer et al., 2008) y *Amphibiocystidium ranae* (Pereira et al., 2005), que se manifiestan en forma de úlceras o pequeñas elevaciones hemisféricas que van de 3 a 5 mm (Pereira et al., 2005). Los dos primeros hongos han sido reportados en huevos de salamandra de *Plethodon cinereus* (Lauer et al., 2008), mientras que *A. ranae* ha sido reportado en *Rana esculenta* y *Rana lessonae* (Pereira et al., 2005). De las enfermedades causadas por hongos patógenos, el de mayor importancia en la actualidad es la quitridiomycosis, causada por el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) (Skerratt et al., 2007) el cual ha sido asociado al dramático declive de un gran 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 et al., 2005, Nichols et al., 2001). Además, se ha reportado un nuevo hongo patógeno emergente llamado *Batrachochytrium salamandrivorans* (*Bsal*) (Martel et al., 2013), que ataca principalmente especies de salamandras. Por ejemplo, las poblaciones de *Salamandra salamandra* en el sur de Europa, se han visto reducidas (Spitzen-van et al., 2013) debido al hongo *Bsal* (Martel et al., 2013). Al igual que el hongo *Bd*, *Bsal* ocasiona erosión y ulceraciones en la piel (Martel et al., 2013). Asimismo, la infección del *Ranavirus*, afecta a más de 14 familias de anfibios como Ranidae; esta enfermedad se manifiesta con anorexia, hemorragias y daños en el hígado (Bollinger et al., 1999, Gray et al., 2009, Miller et al., 2011).

I.I Microbiota de la piel de los anfibios

La primera fase de respuesta de los anfibios ante los patógenos, es el sistema inmune innato que se activa con la presencia de patógenos (Woodhams et al 2007a), y se

estimulan las glándulas de la piel para la síntesis y secreción de péptidos antimicrobianos (AMPs) (Aponyi et al., 2004, Rollins-Smith 2011, Varga et al., 2019). Algunos AMPs son eficaces para reconocer e inducir la disrupción de la membrana celular del patógeno y eliminar la infección por *Bd* o *Bsal* (Brito de Assis, 2016, Burkart et al., 2017, Ujszegi et al., 2017, Smith et al., 2018). Los anfibios también se encuentran protegidos por el sistema inmune adaptativo que involucra diferentes tipos de células como los linfocitos B y T (Colombo et al., 2015). Esta respuesta adaptativa ha sido documentada en la rana *Xenopus laevis*, donde se ha encontrado la presencia de anticuerpos como la inmunoglobulina M (IgM), IgY, IgX en la mucosa (Ramsey et al., 2010). Además, la piel de los anfibios proporciona condiciones adecuadas de temperatura y humedad (Clarke, 2007) para el desarrollo y mantenimiento de una gran diversidad bacteriana (Woodhams et al., 2007a, Lauer et al., 2008, Antwis et al., 2015), estos simbioses bacterianos que habitan la piel de los anfibios (e.j. *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Lysobacter*, *Pedobacter*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* y *Janthinobacterium*), adquieren un papel fundamental contra enemigos naturales, al producir metabolitos de defensa como 2,4-diacetilfloroglucinol, indol-3-carboxaldehído y violaceína (Lauer et al., 2007, Lam et al., 2011, Lauer et al., 2015, Woodhams et al., 2017). Tanto el sistema inmune del anfibio como la microbiota cutánea permiten a los anfibios disminuir la probabilidad de infección, eliminando directamente al patógeno (Woodhams et al., 2007a, Rollins-Smith et al., 2011, Flechas et al., 2012, Varga et al., 2019).

Se ha documentado que la biodiversidad microbiana de la piel de los anfibios es resultado de diversos factores intrínsecos del hospedero y factores extrínsecos

abióticos (McKenzie et al., 2012, Kueneman et al., 2014, Bletz et al., 2017c, Prado-Irwin et al., 2017, Kueneman et al., 2019).

Entre las características del hospedero que estructuran la diversidad de la microbiota, se encuentra la secreción de AMPs (Conlon, 2010) que favorecen el establecimiento de la microbiota, como son los péptidos brevinina-1Ma (Woodhams et al., 2020), tioéteres, sesquiterpenos y metoxipirazinas (Brunetti et al., 2018).

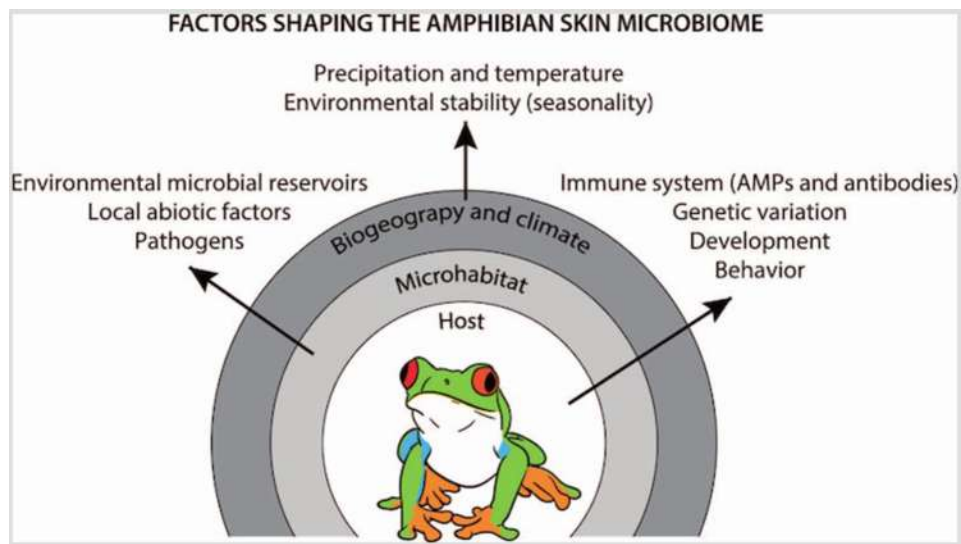


Imagen 1 Rebollar et al (2020). Factores bióticos y abióticos que modulan la estructura y función del microbioma de la piel de los anfibios. Tomado de <https://doi.org/10.1655/0018-0831-76.2.167>

Las relaciones filogenéticas son consideradas un cofactor en la composición de la comunidad bacteriana de los anfibios, a nivel de orden, la comunidad bacteriana que se establece en las especies de salamandra (*Bolitoglossa franklini*, *Bolitoglossa lincolni*, *Bolitoglossa xibalba*, *Pseudoeurycea*) y ranas (*Plectrohyla hartwegi*, *P. lacertosa*, *P. matudai*, *P. sagorum*) de la región de México y Guatemala presentaron

un efecto en la composición de las comunidades microbianas (Ellison et al., 2018), sin embargo este efecto filogenético en especies de Madagascar (Bletz et al., 2017a), y salamandras de los géneros *Ensatina* y *Batrachoseps* resultó ser un predictor limitado en la composición de la comunidad microbiana (Bird et al., 2018).

Además, se ha descrito una transmisión parental de la microbiota de la piel de las hembras a embriones (Banning et al., 2008, Walke et al., 2011, Loudon et al., 2014). En relación con el desarrollo ontogénico de las especies, se ha establecido una relación entre la diversidad bacteriana y el estado ontogénico del anfibio (larva, metamorfo, adulto) donde hay recambio de géneros de bacterias con el desarrollo del anfibio (Kueneman et al., 2014, Prest et al., 2018, Sánchez et al., 2017, Flechas et al., 2018). Por ejemplo, Bresciano et al. (2015) describió que la etapa metamórfica en *Gastrotheca riobambae* se encuentra relacionada con un aumento en las especies bacterianas que no se encuentran en el estado ontogénico de larvas de esta especie. Por otra parte, la tasa de eliminación de la piel favorece la pérdida de la microbiota (Meyer et al., 2012), por ejemplo, en *Litoria caerulea*, el desprendimiento de la piel ocasionó una disminución en las bacterias cultivables (Cramp et al., 2014), mientras que en *Rhinella marina* el desprendimiento de la piel elimina por completo la microbiota cultivable (Meyer et al., 2012), también se ha reportado que la tasa de eliminación de la piel puede disminuir la carga del hongo *Bd* en especies de anfibios como *Limnodynastes tasmaniensis*, *L. peronii*, *L. caerulea*, *Lechriodus fletcheri* (Ohmer et al., 2017).

El estado nutricional del anfibio se ha asociado con la composición de la microbiota, se ha descrito que la dieta rica en carotenoides regula la presencia de

especies bacterianas favoreciendo una mayor riqueza (Antwis et al., 2014, Edwards et al., 2016).

Además de los factores intrínsecos al hospedero, los factores abióticos como la temperatura ambiental y estacionalidad tienen un papel importante en la diversidad microbiana en la piel de los anfibios (Bletz et al., 2017a, Longo et al., 2017, Kueneman et al., 2019), así mismo el aumento en la temperatura corporal ocasiona variaciones en la riqueza microbiana (Longo et al., 2017). La precipitación y el pH ácido del suelo favorecen una mayor diversidad de la microbiota de los anfibios, mientras que el comienzo de la estación húmeda fomenta un cambio en la abundancia de ciertos taxa bacterianos (Varela et al. 2018). Otros factores determinantes, son la riqueza microbiana del suelo y el entorno (Loudon et al., 2014, Kueneman et al., 2016, Elison et al., 2018), se ha descrito que existe una representación de especies bacterianas del entorno, en la piel de los anfibios (Bird et al., 2018). Por ejemplo, algunas especies de ranas dependen de reservorios ambientales microbianos para mantener su microbiota cutánea diversa (Loudon et al., 2014, Kueneman et al., 2016).

I.II Microbiota de la piel de los anfibios en cautiverio

Una medida que se ha implementado para la conservación de especies de anfibios clasificados en alguna categoría de peligro de extinción, es la reproducción *ex-situ* en colecciones de zoológicos, acuarios, laboratorios de investigación, así como colecciones privadas, muchos de los cuales forman parte de una red global de conservación *ex situ* (Zippel et. al. 2011). En México, por ejemplo, la reproducción en

cautiverio de la familia Ambystomatidae ha sido empleada como una estrategia para su conservación por diversas instituciones 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 ANP” (Semarnat, 2018).

En condiciones de cautiverio, las especies de anfibios presentan una menor diversidad microbiana (Becker et al., 2014), uno de los factores en la pérdida de la diversidad se atribuye, a la falta de sustratos como suelo, hojarasca que representan un suministro microbiano para la piel de los anfibios (Kueneman et al., 2016; Loudon et al., 2014). Rebollar et al (2016a) encontraron que la piel de los anfibios se enriquece con especies bacterianas del medio ambiente. Un ejemplo en la pérdida de diversidad son los individuos en cautiverio de la salamandra de espalda roja, *P. cinereus*, los cuales solo compartían ocho OTUs de los más de cuatrocientos OTUs presentes en individuos de vida libre (Loudon et al., 2014). Otros ejemplos de anfibios en cautiverio que han mostrado menor diversidad de la microbiota en la piel con respecto a los de vida libre son: *Mantella aurantiaca* (Passos et al., 2018), *Bombina orientalis* (Bataille et al., 2015), *Cynops pyrrhogaster* (Sabino-Pinto et al., 2016), *Triturus cristatus*, *Lissotriton vulgaris* (Bates et al., 2019), *Agalychnis callidryas* (Antwis et al., 2014), *Cryptobranchus a. alleganiensis* y *C. a. bishopi* (Hernández-Gómez et al., 2018). Esta disminución en la diversidad microbiana en la piel de los anfibios, puede ocasionar una mayor susceptibilidad a los patógenos (Antwis y Harrison, 2018)

ocasionando un efecto negativo en la salud del hospedero (Knutie et al., 2017).

I.III Microbiota de la piel de los anfibios inhibidora del crecimiento de patógenos

Parte de la supervivencia de los anfibios expuestos a patógenos está relacionada con la capacidad de la microbiota para inhibir el desarrollo de patógenos (Lam et al., 2010) causantes de enfermedades emergentes, como *Bd*, *Mariannaea sp.* y *Ranavirus* (Bletz et al., 2017c, Harris et al., 2009, McKenzie et al., 2012, Antwis y Harrison, 2017, Madison et al., 2017, Flechas et al., 2017).

Estas comunidades bacterianas tienen la capacidad de producir compuestos volátiles y metabolitos secundarios de defensa contra patógenos, que permiten disminuir o eliminar el patógeno (Flechas et al., 2017). Ejemplos de estos son la violaceína producida por la bacteria *Janthinobacterium lividum* (Brucker et al., 2008, Muletz et al., 2012, Woodhams et al., 2017), la prodigiosina producto del metabolismo de las bacterias *Serratia marcescens* y *S. plymuthica* (Woodhams et al., 2017). Otros compuestos capaces de inhibir el crecimiento del hongo *Bd* es el indol-3-carboxaldehído (Brucker et al., 2008, Lam et al., 2011), el 2,4-diacetilfloroglucinol producido por *Pseudomonas fluorescens* (Myers et al., 2012). También se ha descrito en la piel de *Lithobates sphenoccephala*, la bacteria *Rhodococcus fascians* que produce compuestos orgánicos volátiles antimicóticos (Woodhams et al., 2016). Así mismo, *S. marcescens* presentan una fuerte actividad anti-*Bd* en los ensayos de sobrenadantes sin células (Madison et al., 2017), otros ensayos que se han usado para probar la capacidad de las bacterias anti *bd* son los ensayos de inhibición de crecimiento (Brucker et al., 2008, Flechas et al., 2012, Myers

et al., 2012).

Las bacterias con la capacidad para inhibir el crecimiento del hongo *Bd* se encuentra ampliamente distribuidas entre especies de anfibios, independientemente de la elevación a la que se encuentren ya sea 560-3,695 msnm, de acuerdo con datos de la región de Valle de Kosñipata, Perú (Catenazzi et al., 2018).

Tabla 1: Ejemplo de algunas bacterias con la capacidad para inhibir el crecimiento del hongo *Bd*

Especie de anfibio	Bacterias anti-bd	Lugar	
<i>Dendropsophus rhodopeplus</i>	<i>P. entomophila</i> y <i>S. marcescens</i>	Valle de Kosñipata, Perú (560 msnm)	Catenazzi et al., 2018
<i>Telmatobius marmoratus</i>	<i>P. fluorescens</i>	Valle de Kosñipata (560 msnm)	Catenazzi et al., 2018
<i>Rana cascadae</i>	<i>Acidovorax sp.</i> y <i>Chryseobacterium sp.</i>	Cordillera Klamath	Roth et al., 2013
<i>Gastrotheca riobambae</i>	<i>P. fluorescens</i> y <i>Serratia sp.</i>	Montañas de Ecuador	Bresciano et al., 2015
<i>Atelopus elegans</i>	<i>Acinetobacter sp.</i> , <i>Chryseobacterium sp.</i> , <i>Comamonas sp.</i> , <i>Cupriavidus sp.</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Stenotrophomonas sp.</i>	Bosques costeros de Colombia	Flechas et al., 2012
<i>Atelopus superrelli</i>	<i>Acinetobacter sp.</i> , <i>Comamonas sp.</i> , <i>Elizabethkingia</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Sphingomonas sp.</i> , <i>Stenotrophomonas sp.</i>	Bosques costeros de Colombia	Flechas et al., 2012

<i>Atelopus aff. limosus</i>	<i>Acinetobacter sp.</i> <i>Chryseobacterium sp.</i> <i>Comamonas</i> <i>sp.Elizabethkingia sp.</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> ,	Bosques costeros de Colombia	Flechas et al., 2012
<i>Leiopelma archeyi</i>	<i>Flavobacterium sp.</i>	Nueva Zelanda	Shaw et al., 2014
<i>Plethodon cinereus</i>	<i>Bacillus</i> <i>Lysobacter</i> <i>Pseudomonas</i>	Condado de Rockingham, Virginia	Harris et al., 2006
<i>Hemidactylium scutatum</i>	<i>Arthrobacter</i> <i>Bacillus</i> <i>Kitasatospora</i> <i>Paenibacillus</i> <i>Pedobacter</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Streptomyces</i>	Condado de Rockingham, Virginia	Harris et al., 2006

Sin embargo, son pocos los estudios que analizan la microbiota de la piel con capacidad para inhibir patógenos, en individuos en condiciones de cautiverio. Flechas et al., (2017) encontraron que especies de ranas del género *Atelopus* en condiciones de cautiverio, mantienen solo un 50% las bacterias con capacidad de inhibir el hongo *Bd*. Otro ejemplo es *A. elegans*, que conservó tres géneros anti-*Bd* (*Citrobacter*, *Enterobacter* y *Pseudomonas*) mientras que los ejemplares de vida libre presentaron siete géneros de bacterias. *A. limosus*, tuvo once géneros en vida libre con capacidad inhibitoria de *Bd*, en comparación con los siete géneros en cautiverio, algunos de los géneros bacterianos reportados con esta capacidad anti-*Bd* en estas especies son *Acinetobacter sp.*, *Chryseobacterium sp.*, *C. meningosepticum*, *P. putida*, y *Pseudomonas sp.* (Flechas et al., 2017).

I.IV Capacidad de formación de biopelículas y swarming

A pesar de la gran cantidad de estudios enfocados en analizar la diversidad de la microbiota de la piel de los anfibios, con capacidad para inhibir el crecimiento de patógenos como el *Bd*, pocos han explorado los mecanismos y propiedades de estas comunidades simbiotas, capaces de inhibir a *Bd* al producir metabolitos. Una propuesta es el análisis de la capacidad de formación de biopelículas para inhibir el desarrollo del *Bd* y el swarming de las bacterias. Piovio-Scott et al. (2017) demostraron en un sistema in vitro que las biopelículas formadas por diversas especies bacterianas reducen el desarrollo del hongo *Bd*.

El ambiente de la mucosa en la superficie de los anfibios es propicia para albergar una gran cantidad de bacterias simbióticas (Clarke, 2007), estas bacterias pueden llegar a formar biopelículas, caracterizados por ser comunidades bacterianas densas unidas a una superficie sólida, encerradas en una matriz extracelular (Stoodley et al. 2002, Hall-Stoodley et al. 2004, Lai et al., 2009). Esta matriz extracelular producida por las bacterias está compuesta principalmente de proteínas, exopolisacáridos y ADN (Flemming y Wingender, 2010). Los exopolisacáridos secretados por las bacterias, darán lugar a la estructura de la biopelícula permitiéndole a esta forma de vida una mayor adhesión, estabilidad (Flemming y Wingender, 2010, Yaroon y Römling, 2014), retención de agua y disponibilidad de nutrientes (Yaron y Römling, 2014), de esta manera la biopelícula representa una estrategia de supervivencia que garantizan la protección de la comunidad a ambientes desfavorables (Fuente-Núñez, 2013) como cambios en el pH (Welin-Neilands, 2007), condiciones salinas, factores estresantes (deshidratación) (Magrex-Debar et al.,

2000), agentes bactericidas (Vestby et al., 2020). La protección que confiere la biopelícula a la comunidad bacteriana hace que se le considere un factor de virulencia por la resistencia de la biopelícula a la administración de fármacos (Lapidot et al., 2006).

Otra característica de estas comunidades bacterianas, es el aumento en la biosíntesis flagelar (Blair et al., 2008, Kearns, 2010), estos flagelos se asocian con una mayor movilidad bacteriana, permitiéndoles una mayor expansión radial, mayor obtención de nutrientes y una mejora en la eficiencia de colonización de las células sobre la superficie del hospedero (Kumar et al., 2013), permitiéndoles a las bacterias proliferar debido a que cuentan con mecanismos para desarrollarse en un medio favorable (Hobley et al., 2015).

Se ha documentado en sistemas simbióticos, la presencia de genes relacionados con la formación de biopelículas. Recientemente, Rebollar et al., (2018) describieron diversos genes involucrados en la comunicación bacteriana e interacción bacteria-hospedero, como la formación de biopelículas y secreciones bacterianas en la rana *Craugastor fitzingeri*, así mismo Frese et al., (2013) encontraron genes (gen; r70892, lr70532, lr70114) que participan en la formación de biopelículas epiteliales en el estomago del ratón. Algunos otros podrían regular estas formaciones como el gen ybiM y yceP, (Fink et al., 2012). La formación de biopelículas va a desempeñar un papel importante en las interacciones beneficiosas, incluidas las simbiosis con otros organismos, como la formación de biopelículas en los tejidos vegetales (Yaron y Romling 2014) y animales (Frese et al., 2013, Rebollar et al., 2018). Sin embargo, las biopelículas microbianas asociadas al hospedero pueden tener efectos dramáticos

sobre salud animal y humana (Lapidot et al., 2006). Actualmente, las técnicas independientes de cultivo han mejorado enormemente la capacidad de caracterizar comunidades microbianas formadoras de biopelículas asociadas a un hospedero (Fierer 2012), facilitando la capacidad de vincular la composición de la comunidad con las funciones ecológicas, como la resistencia a la invasión de patógenos en anfibios (Piovia-Scott et al. 2017). Por lo tanto, conocer la capacidad de resistencia de la microbiota a los patógenos, resulta de gran valor para la conservación de los anfibios.

I.V Identificación taxonómica de bacterias

La identificación taxonómica en bacterias puede llevarse a cabo por medio de métodos tradicionales de cultivos o herramientas moleculares (Lauer et al., 2007). De acuerdo con Walke et al, (2015) el porcentaje de la microbiota cultivable para cada especie varía de 2.81% a 7.47%, este porcentaje de desarrollo bacteriano en los cultivos puede estar determinado por la cooperación metabólica entre los microorganismos (García-Mazcorro et al., 2015), y a la imposibilidad de recrear las condiciones de temperatura y humedad del hospedero en el laboratorio. Los métodos tradicionales de cultivo intentan establecer las condiciones de vida naturales del microorganismo para su desarrollo *in vitro*, permitiéndonos conocer los fenotipos, mientras que los métodos moleculares identifican los organismos con base en datos genéticos (García-Mazcorro et al., 2015).

En la microbiología tradicional se utilizan dos tipos de medios de cultivo: los complejos y los químicamente definidos. En los medios químicamente definidos se conoce la composición química exacta, mientras que en los complejos se desconoce

la composición nutritiva que emplean (Madigan et al., 2004). Generalmente, estos medios se encuentran compuestos de amortiguadores de pH, carbono, nitrógeno, fósforo, sodio, potasio, vitaminas, etc. (Madigan et al., 2004, Barrero, 2006).

Dependiendo de la proporción de agar contenido serán líquidos, sólidos o semisólidos (Barrero, 2006). El agar nutritivo es el medio más común en la microbiología, generalmente, se encuentra compuesto por una peptona simple y un extracto de carne (Arulanantham et al., 2012), algunos de ellos son R2A agar, agar soya tripticaseína, agar tryptona extracto de soya que son medios generales.

Las herramientas moleculares a diferencia de los métodos tradicionales de cultivo, nos otorgan una identificación más precisa de los organismos (Han et al., 2002, Mignard y Flandrois., 2006) y facilitan el reconocimiento de enfermedades bacterianas inusuales y emergentes (Drancourt et al., 2004). El gen *16S rRNA* de aproximadamente 1.542 nucleótidos de longitud es un marcador molecular que en la actualidad es usado con fines taxonómicos para identificar bacterias a nivel de especie (Baker et al., 2003, Astrin et al., 2006), proporciona información filogenética de los organismos y permite identificar secuencias en bases de datos por porcentaje de similitud (> 97%) en Unidades taxonómicas operativas (Kembel et al., 2012, Chen et al., 2013, García-Mazcorro et al., 2015, Nguyen et al., 2016). Este marcador se amplifica a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Karp, 2006). Esta técnica emplea una polimerasa termoestable (TAQ) que añade nucleótidos complementarios en hebras simples de ADN, replicando una secuencia específica de ADN (Arnheim y Eelich 1992, Karp, 2006). La acción de la polimerasa ocurre de manera sucesiva generando millones de copias del fragmento genético. Los

fragmentos amplificados de ADN pueden ser visualizados en geles de agarosa. Este tipo de PCR es conocido como PCR de punto final y su resultado es cualitativo, ya que indica la presencia o ausencia del fragmento de ADN, posteriormente se realiza una purificación y secuenciación del producto de PCR (Karp, 2006), la secuenciación nos permite usar herramientas como BLAST para encontrar regiones de similitud entre secuencias biológicas.

Otra técnica de identificación de la microbiota de la piel es la metagenómica, herramienta con la cual podemos analizar el ADN de toda una comunidad (Gilbert y Dupont, 2011, Lara, 2015). Esta técnica nos permite conocer un solo gen o todos los genes de una comunidad (*Shotgun*) (Gilbert y Dupont, 2011). Estos estudios han permitido describir la microbiota de *A. mexicanum*, *A. tigrinum* entre otras especies de salamandras (Mckenzie et al., 2012, Demircan et al., 2018). Tanto la metagenómica o la secuenciación masiva de amplicones del gen 16S rRNA han permitido conocer las comunidades bacterianas de la piel de diferentes especies de anfibios (Lauer et al., 2007). Sin embargo, parte de la importancia de los cultivos bacterianos es que son útiles en trabajos experimentales que permiten identificar bacterias que producen metabolitos clave, que pueden funcionar como terapia de probióticos (Lauer et al., 2008). De ahí la importancia de conocer la estructura microbiana cultivable.

Debido a la capacidad de las bacterias para controlar patógenos, son consideradas una herramienta en beneficio de la conservación de especies vulnerables ante *Bd* (Woodhams et al., 2016). Por medio de la bioaugmentación, que es la adición de bacterias vivas que otorgan beneficios a la salud del huésped, es posible transmitir una mayor resistencia a las enfermedades infecciosas, por medio de

la inoculación de bacterias probióticas (Vredenburg et al., 2011). Por ejemplo, la bioaumentación con la bacteria *J. lividum*, ha sido eficiente en reducir de manera exitosa la sintomatología causada por el hongo *Bd* en la salamandra *P. cinereus* en condiciones de laboratorio (Harris et al., 2009a). Estos resultados son similares a los descritos en *Anaxyrus boreas*, donde se utilizó la misma bacteria (Kueneman et al., 2016). Estos protocolos de bioaumentación se han llevado a cabo en poblaciones naturales, encontrando una respuesta favorable en la sobrevivencia de especies (Vredenburg et al., 2011). Sin embargo, existen pocos trabajos que han estudiado las capacidades de la microbiota cultivable como posibles agentes probióticos.

I.VI *Ambystoma ordinarium*

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 et al., 2014). En relación con el estado de Michoacán se han registrado 54 especies de anfibios (Alvarado-Díaz et al., 2013) pertenecientes a nueve familias, mismas que representan el 14.5% de la riqueza total de especies de anfibios que hay en México, por otro lado, 31 de ellas son especies endémicas del estado de Michoacán, ubicándolo como el quinto estado con mayor número de endemismos (Hancuz-Elías, 2005, Parra-Olea et al., 2014).

Específicamente, en el estado de Michoacán, se encuentran 7 especies de la Familia *Ambystomatidae* (Soto, 2012) de las cuales 3 son endémicas (*A. dumerilii*, *A. andersoni* y *A. amblycephalum*) y otras dos son endémicas a Michoacán y Estado de México (*A. rivulare* y *A. ordinarium*) (CONABIO et al., 2005, Ahumada, 2004).

A. ordinarium es un anfibio acuático paedomórfico facultativo, este fenómeno le permite mantener rasgos juveniles (branquias externas, aleta caudal alta) en la fase adulta, de esta manera el desarrollo y madurez sexual se da de forma acuática (Groef et al., 2018). *A. ordinarium* habita en arroyos de montañas, con bosques de pino y abeto en el cinturón volcánico transversal mexicano (Taylor., 1940, Soto et al., 2017) donde las temperaturas bajas oscilan alrededor de los 16.64°C (Soto., 2012). *A. ordinarium* presenta desplazamientos menores a los 5 m. que podrían estar correlacionados con la búsqueda de alimento, pareja y calidad del ambiente (Montes-Calderón et al., 2011). La temporada de reproducción de esta salamandra se presenta en temporada de lluvias (Escalera et al., 2018). La alimentación de esta salamandra se compone de larvas de insectos, saltamontes, escarabajos buceadores, lombriz de tierra, larvas de mosquitos, ninfas de libélulas, escarabajo excavador, hormigas y almejas (Alvarado-Díaz et al., 2003), Shaffer (1989) clasifica a *A. ordinarium* como depredador ápice en los arroyos de montaña donde se distribuye, debido a que ocupa el nicho de los peces, que se encuentran ausentes de forma natural en este tipo de arroyos. *A. ordinarium* es una especie muy susceptible a cambios dentro de su hábitat, la cual se encuentra en constante cambio por cuestiones antropogénicas como la urbanización y las actividades agrícolas, lo que ha propiciado disminuciones en sus poblaciones (Soto et al., 2017, Escalera et al., 2018). En la actualidad esta especie se encuentra catalogada en la lista roja de la UICN en peligro de extinción (<https://www.iucnredlist.org>) y en la NOM-059 como especie sujeta a Protección Especial (Diario Oficial de la Federación 2010).

Debido al creciente número de anfibios en la lista roja se han desarrollado

programas de conservación *ex situ*, con la finalidad de reintroducirlas a sus hábitats en un futuro (Griffiths y Pavajeau 2008). Estos programas de conservación se han enfocado principalmente en especies de anfibios en peligro de extinción (Griffiths and Pavajeau 2008). En lo que se refiere a la familia Ambystomatidae, especies como *A. granulosum* y *A. lermaense* se han mantenido con éxito en el Centro de Investigaciones y Recursos Bióticos (CIRB) de la Universidad Autónoma del Estado de México, por más de 10 años con reproducciones exitosas, ambas especies están amenazadas y son endémicas de México (Aguilar-Miguel et al., 2009). Otra especie que ha sido reproducida *ex situ* desde 1863 es *A. mexicanum*. (Casas et al., 2003). Tanto *A. mexicanum* como *A. granulosum* y *A. lerma* han sido usadas con fines de investigación (Casas et al., 2003, Aguilar-Miguel et al., 2009).

Los estudios relacionados con *A. ordinarium* se han centrado en descripción (Taylor, 1940), distribución (Shaffer, 1989, Anderson y Worthington, 1971), dieta (Alvarado et al., 2003), estudios filogenéticos (Welsrock et al., 2006), abundancia, actividad espacial y crecimiento (Montes-Calderón et al., 2011) así como el uso y selección de microhábitat (Soto, 2012).

III. JUSTIFICACIÓN

La microbiota de la piel del género *Ambystoma*, ha sido estudiada en especies como *A. tigrinum*, en la cual se encontraron más de 12 familias bacterianas en las que destaca el filo Bacteroidetes (Mckenzie et al., 2012). Se han realizado de igual manera estudios donde se compara tanto la microbiota de la piel, el estómago y muestras fecales, en *A. mexicanum* en cautiverio (Demircan et al., 2018). Los autores

encontraron comunidades bacterianas diferentes dependiendo del origen de la muestra, y la etapa de desarrollo del organismo, siendo las más abundantes Proteobacteria, Bacteroidetes y Firmicutes (Demircran et al., 2018). Ambos estudios han utilizado la metagenómica con el fin de conocer la composición microbiana y el efecto de la muda en *A. mexicanum*. Así mismo, se han analizado abscesos de diferentes zonas del cuerpo de *A. mexicanum*, con métodos de cultivos e identificación por métodos bioquímicos encontrando principalmente especies del género *Pseudomonas* (Negrete et al., 1999).

Reconociendo la importancia que tiene la microbiota cultivable en la protección de los anfibios contra patógenos, en este estudio analizamos la composición de la comunidad bacteriana cultivable de *A. ordinarium* en condiciones de cautiverio, con el fin de conocer su diversidad, capacidad de movilidad por swarming como una característica que les permite a las bacterias cubrir más superficies (Kumar et al., 2013), mientras que el crecimiento microbiano en forma de biopelícula garantiza una mayor resistencia a los factores externos desfavorables. (Fuente-Núñez, 2013) lo que podría estar asociado a la protección contra patógenos. Así mismo generamos un reservorio genético de las bacterias cultivables que puedan servir en posibles mecanismos de bioaumentación, en sitios afectados por *Bd*.

III. OBJETIVO GENERAL

Analizar la diversidad taxonómica y capacidad de movilidad por swarming de la microbiota cultivable de la piel de *A. ordinarium* en condiciones de cautiverio.

III. I Objetivos particulares

- Cultivar y aislar la microbiota de la piel de *A. ordinarium* en cautiverio.
- Caracterizar morfológicamente las bacterias cultivadas de *A. ordinarium*
- Identificar taxonómicamente por métodos moleculares la microbiota cultivable de *A. ordinarium* en cautiverio.
- Determinar la capacidad de movilidad por swarming de las bacterias cultivadas de la piel de *A. ordinarium* en cautiverio.

IV. HIPÓTESIS

La microbiota cultivable de la piel de *A. ordinarium* en condiciones de cautiverio tienen diversas especies cultivables que presentan movilidad por swarming.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

V.I Sistema de estudio

A. ordinarium habita en elevaciones superiores a los 2200 msnm en arroyos de montaña del estado de México y Michoacán (Anderson y Worthington, 1971, Soto et al., 2017). En estado adulto llega a medir de 70 a 75 mm. generalmente tienen un dorso oscuro con melanóforos (células con pigmentos que reflejan la luz) dispersos en la aleta dorsal y en algunos dispersos en la aleta ventral, tanto en estado juvenil,

como en estado adulto presentan branquias (Anderson y Worthington, 1971).

Generalmente tienen desplazamientos menores a los 5m, principalmente por alimento o por búsqueda de pareja (Montes-Calderón et al., 2011), su época de reproducción es prolongada, y abarca de julio a enero, sus óvulos están pigmentados y tiene un diámetro promedio de 2.88 mm. (Anderson y Worthington, 1971).



Imagen 2 Ejemplar de *A. ordinarium* del Laboratorio de Herpetología del Instituto de Investigaciones sobre Recursos Naturales, UMSNH

V. II Toma de muestras

Se realizó el aislamiento de la microbiota bacteriana de 13 individuos en cautiverio que se encuentran en el Laboratorio de Herpetología del Instituto de Investigaciones sobre Recursos Naturales, UMSNH. Todos los individuos fueron capturados en el mes de junio del año 2017, cuatro fueron recolectados en Puerto Madroño, tres de Piedra Redonda y La Reja, dos de las Golondrinas y uno de Turiran, todos pertenecientes a Michoacán. El aislamiento de la microbiota se realizó en el mes de mayo del año 2018. Los individuos fueron manipulados con guantes nuevos, se frotaron 10 veces en la parte ventral, 10 a lo largo del dorso y así mismo sobre las branquias usando un hisopo estéril (*Dryswab, Medical Wire*), utilizando la metodología propuesta por Walke

et al., (2015a). El hisopo se colocó en un tubo *Eppendorf* con un 1 ml de caldo de cultivo, previamente esterilizado, para ser transportado al laboratorio de Microbiómica en la Escuela Nacional de Estudios Superiores, unidad Morelia, UNAM.

V.III Cultivo de muestras

Cada una de las muestras se sembró por duplicado, con siembras por estría en caja, utilizando el hisopo de la toma de muestra. Se emplearon tres medios de cultivo: Agar R2A (SIGMA-ALDRICH), Agar Soya Trypticaseína (BD Bioxon), Agar tripton extracto de levadura (SIGMA-ALDRICH). Los medios fueron esterilizados a 150°C durante 20 minutos, usando una autoclave (TV3C TETSAKA) y consecutivamente fueron vaciados en cajas petri estériles (60X15mm Interlux). Las placas se dejaron enfriar antes de ser invertidas y selladas con parafilm. Estos medios fueron sembrados de manera aleatoria, utilizando un medio diferente en la primera siembra, y posteriormente se realizó la siembra en los otros dos medios. Estos medios son considerados generalistas y han sido previamente reportados para el cultivo de microbiota de piel de anfibios (Banning et al., 2008, Flechas et al., 2012, Walke et al., 2015a).

Los cultivos se incubaron a 30°C en oscuridad por 48 horas. Una vez que se obtuvieron colonias, las placas fueron transferidas a una temperatura de 4 °C, se registró la morfología de las distintas colonias y se tomaron fotografías con una cámara Canon de 8X optical zoom. Las fotos fueron procesadas en el programa *ImageJ* (2.0.0) con el fin de determinar el área ocupada por la colonia estimando y comparando el crecimiento de cada morfotipo de las colonias. El crecimiento de las

bacterias se puede utilizar como medida de adecuación en función de las restricción ambiental y genéticas (Bischof et al., 2016). Esta información es utilizada principalmente en investigación clínica básica, para la descripción del fenotipo de las bacterias o describir la resistencia a drogas (Nichols et al., 2011). Para evaluar cuantitativamente el crecimiento bacteriano, pueden utilizar métodos basados en analizar digitalmente el área de crecimiento de cada morfotipo de bacteria (Macedo et al., 2011).

V.IV Análisis estadísticos

Para determinar diferencias en el área cubierta por colonia con distintos caracteres morfológicos, utilizamos para cada variable de respuesta un modelo lineal generalizado con distribución Poisson, y una prueba de Least significant difference (LSM) para comparaciones de medias.

V.V Aislamiento y purificación de colonias

Las colonias obtenidas de la siembra se seleccionaron de acuerdo con la morfología, cada colonia fue transferida a un nuevo medio de cultivo estéril, usando una asa de siembra previamente esterilizada, se trazaron estrías con el fin de que el número de cepas disminuyera conforme avanza la estría, de esta manera se obtuvieron cepas puras (Madigan et al., 2004), se realizaron tres pases de cada una de las colonias seleccionadas, en cada pase se utilizó el mismo medio de donde se obtuvo la colonia (Agar R2A, Agar Soya Trypticaseína, Agar triptona extracto de levadura), todos los aislados tuvieron las mismas condiciones, 30 °C de incubación en oscuridad por 48 horas. En el tercer pase se obtuvieron colonias puras. Las cepas de estas colonias

fueron colocadas en 5 ml de medio líquido (Luria Bertani-LB) y se incubaron por 24 horas a 30°C, para su crecimiento, transcurrido el tiempo se preservaron en un cepario en glicerol al 20 % a -80 °C.

V.VI Tinción de Gram

La tinción de Gram nos permite conocer las características morfológicas de la pared bacteriana con el fin de separarlas en dos grandes grupos, las Gram negativas, y las Gram positivas por medio una tinción diferencial (López-Jácome et al., 2013). Con esta tinción la pared celular de las bacterias adquiere una coloración morada o roja, de acuerdo con la estructura de la pared celular de las bacterias, en el caso de las bacterias Gram negativas se encuentran rodeadas por dos membranas, la membrana externa es rica en lipopolisacáridos, mientras que la pared en las Gram positivas está formada fundamentalmente por fosfatidilglicerol (Madigan et al., 2003). Para realizar esta tinción se colocó sobre un portaobjetos una gota de agua y una pequeña porción de cultivo bacteriano, con el asa de siembra estéril. Con ayuda del asa se extiende la muestra sobre el portaobjetos, se dejó secar por unos segundos y se fijó la preparación, pasando tres veces a través de la llama del mechero el portaobjetos (Madigan et al., 2004). Se cubrió con unas gotas de cristal violeta durante 1 minuto, este colorante fue retenido solamente por las bacterias Gram positivas (Beveridge, 2001, Madigan et al., 2004). Posteriormente se realizó un lavado del exceso de colorante con lugol (yodo-yoduro potásico), pasado el minuto se lavó el exceso de lugol con alcohol acetona, para luego cubrir con el colorante de contraste, safranina (carbón fucsina) durante 1 minuto, las bacterias teñidas con este colorante fueron parte del grupo Gram negativas (Beveridge, 2001, Madigan et al., 2004). Se lavó el

exceso de colorante con alcohol acetona y se dejó secar al aire. Para la observación de los frotis se añadió una gota de aceite de inmersión, estos frotis fueron observados y fotografiados en un microscopio AmScope (T490B-10MT), con el programa AmScope se obtuvo la longitud de diez bacterias.

V.VII Extracción de ADN

La extracción de ADN bacteriano se realizó con el kit *Powersoil DNA Isolation* siguiendo el siguiente protocolo: se colocó 1 ml de cultivos axénicos en medio LB en un tubo *ependorf* y se centrifugó por un minuto a 10 000 rpm para obtener una pastilla bacteriana, después de retirar el sobrenadante se adicionaron 60 µl de la solución C1 junto con el líquido del tubo Power Bead con la finalidad de retirar las perlas. Se agitó en vórtex por 10 minutos y se centrifugó a 10 000 rfc por 30 segundos, posteriormente se incubó por 10 minutos en hielo y se centrifugó 1 minuto. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo al cual se le agregaron 250 µl de la solución C2, se agitó en vórtex por 5 segundos para después incubar en hielo por 10 minutos, y centrifugar a 10000 rfc por 1 minuto. El sobrenadante fue transferido a un tubo limpio con 200 µl de Solución C3, se agitó brevemente, se incubó 8 minutos y centrifugó durante 1 minuto a 10000 rpm. El sobrenadante se mezcló en 1 200 µl de Solución C4 y se agitó en vórtex durante 5 segundos. Posteriormente se colocaron 675 µl en un filtro y se centrifugó a 10000 rfc durante 1 minuto hasta filtrar todo el sobrenadante. Al tubo con el filtro se le agregó 500 µl de Solución C5 y se centrifugó 30 segundos, se descartó el líquido y se volvió a centrifugar, se retiró el filtro y se colocó en un tubo nuevo con 30 µl de solución C6 y se centrifugó por 30 segundos, posteriormente el ADN se almacenó a -20 °C.

Para visualizar los fragmentos de ADN se realizó una electroforesis en gel de agarosa. El gel fue preparado con agarosa y buffer TAE 0.5X (preparado a partir de TAE 5X que contiene 500 ml/54 g de Tris base, 27.5 ml de ácido bórico y 10 ml de EDTA 0.5 M pH 8.0), ya disueltos se agregó como colorante *Sybr Safe*. Después, la solución fue servida en un molde hasta su gelificación. La electroforesis se realizó en una solución de buffer TAE 0.5 X a 80V durante 45 minutos y las imágenes de los geles se capturaron en una cámara de *Bio-Rad*. La calidad y concentración de ADN se determinó en un Thermo *Scientific Nanodrop 2000*.

V.VIII Amplificación y secuenciación de ADN

Se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando cebadores del gen 16S rRNA (27F; AGAGTTTGATCMTGGCTCAG y 1492R; TACGGYTACCTTGTTACGACTT) (Brunetti et al., 2018). El volumen total del PCR fue de 16 μ l, preparado con 7.5 μ l Master Mix, 1 μ l de cada cebador con una concentración de 10 μ M, 4.2 μ l de H₂O, 1 μ l de ADN a una concentración de 5 ng/ μ l y 1.3 μ l de BSA. Para la reacción de PCR se utilizó un termociclador (Bio Rad T100™) con el siguiente programa; una temperatura inicial de 95°C por 3 min para la desnaturalización, posteriormente se realizaron 17 ciclos a 95°C por un 1 min., se bajó la temperatura a 61°C por 30 min, para unir los cebadores a la cadena de ADN, después la temperatura se elevó a 72°C por 1min para que la polimerasa coloque nucleótidos al extremo 3' de los cebadores. La extensión final fue a una temperatura de 72°C por 10 min. Las muestras se procesaron con un control negativo. Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1 %. Una vez amplificados los fragmentos se mandaron a secuenciar a Macrogen USA Corp. Las secuencias

fueron editadas y alineadas con el programa MEGA v. 10.0.5, y para la identificación taxonómica de las bacterias se utilizó la base de datos Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)

V.IX Filogenia

Para realizar el árbol filogenético se utilizaron 58 secuencias obtenidas con los cebadores 27F y 1492R de las bacterias de la piel de *A. ordinarium*, y 22 secuencias de diferentes especies (*Acidovorax*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Lysinibacillus*, *Mircobacterium*, *Novosphingobium*, *Pseudomonas*) tomadas de la base de datos de aislados que inhiben el hongo *Bd* en cultivos de Woodhams et al., (2015), y una especie del género *Pyrococcus* (AY099167) para ser usada como grupo externo. Se usó una región de 911 pares de base del gen 16S rRNA. Con el programa MEGA (7.0.26) estas secuencias fueron alineadas y cortadas. Utilizando JModel Test (2.1.10) bajo el criterio de Akaike, se seleccionó el modelo que mejor explicara los datos (TIM3 + G). Con el sitio web Cipres Science Gateway (V 3.3), se usó el método de inferencia Bayesiana con el programa de MrBayes usando el modelo de evolución anterior. La edición del árbol consenso se visualizó y se editó con el programa INTERACTIVE TREE OF LIFE (ITOL v5).

V.X Swarming y biopelículas

Se analizó la capacidad de movilidad por swarming de 46 cepas de la piel de *A. ordinarium*. Las cepas se inocularon en medio líquido LB, y se incubaron por 24 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, un inóculo de cada cepa se colocó en el centro de una placa de Agar Soya Trypticaseína (concentración de agar mayor a

1.5%) y se dejó crecer de 24 a 72 hrs a 37 °C (Kearns et al., 2003, Kumar et al., 2013). Pasadas las 72 horas de la incubación, las placas se fotografiaron sobre un fondo negro (Kearns et al., 2003), con una cámara Canon de 8X optical zoom. Las fotos fueron procesadas en el programa ImageJ (2.0.0) con el fin de determinar el diámetro formado por las cepas.

Como parte de la tesina de licenciatura en Biotecnología "Evaluación de la capacidad de formación de biopelículas en bacterias de la piel aisladas de los ajolotes *A. altamirani* (Dugés, 1895) y *A. ordinarium* (Taylor, 1940)", de la estudiante Aneli Vanessa Flores, bajo la tutoría de la Dra. Eria Alaide Rebollar Caudillo, del laboratorio de Biología de Sistemas y Biología Sintética, del Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM, se evaluó la capacidad de formación de biopelículas de acuerdo a la metodología de O'Toole et al. (2011) de 45 aislados de *A. ordinarium* obtenidos en esta tesis. La escala de clasificación de biopelículas se basó en la metodología de Stepanovic (2007). Los resultados del trabajo realizado por Aneli, aportaron información sobre la capacidad de formación de biopelículas, que se utilizaron en este trabajo, para comparar resultados, integrar información y discutir los datos generados en la presente tesis.

VI. RESULTADOS

VI. I Descripción morfológica de colonias bacterianas

Se obtuvieron un total de 896 colonias de bacterias en los tres medios de cultivo. La morfología de las colonias bacterianas de la piel de *A. ordinarium* presentaron una gran diversidad de formas, texturas y colores en los tres medios de cultivos utilizados.

De los tres medios, el medio Agar triptona extracto de levadura fue el que presentó una mayor área cubierta por colonias ($X^2= 7.35$, g.l.= 2, $P = 0.025$) (**Figura 1**).

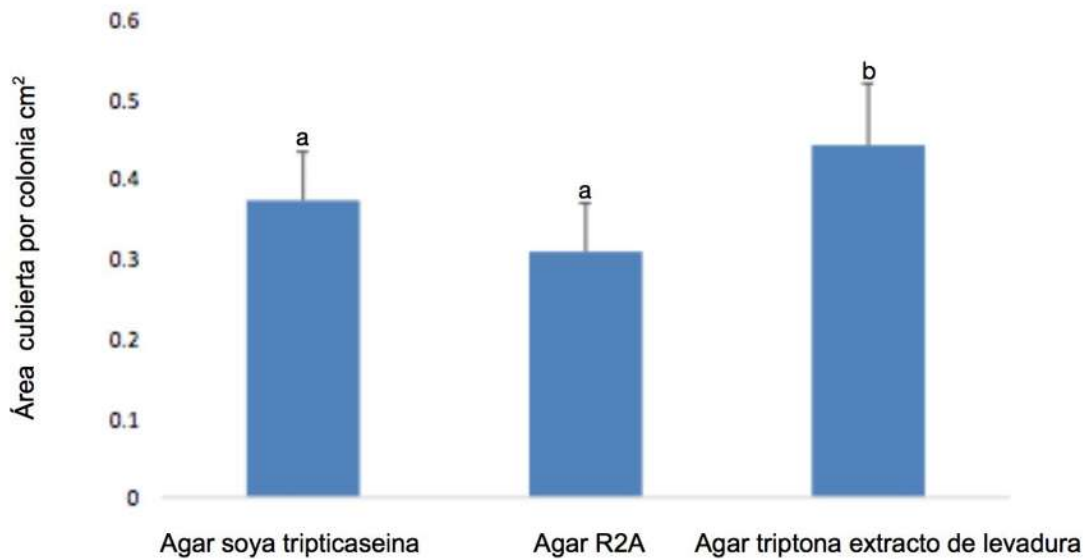


Figura 1 Área cubierta por colonia en los 3 medios de cultivo utilizados, mostrando el porcentaje de error en cada columna. Las letras diferentes indican las medidas que son significativamente diferentes entre las áreas de las colonias de acuerdo con la prueba LSM

Respecto a la diversidad de colores se encontraron colonias de color amarillo, beige, blanco, durazno, melón, naranja y perla. Los colores con la mayor área cubierta por colonia fueron el color melón en el medio de cultivo agar R2A y el color beige en el medio de cultivo agar triptona extracto de levadura ($X^2= 128.61$, g.l.= 9, $P = 0.0001$) (**Figura 2**). Los colores melón y naranja fueron más abundantes a diferencia del color amarillo, blanco y durazno que presentaron una menor área en los tres tratamientos.

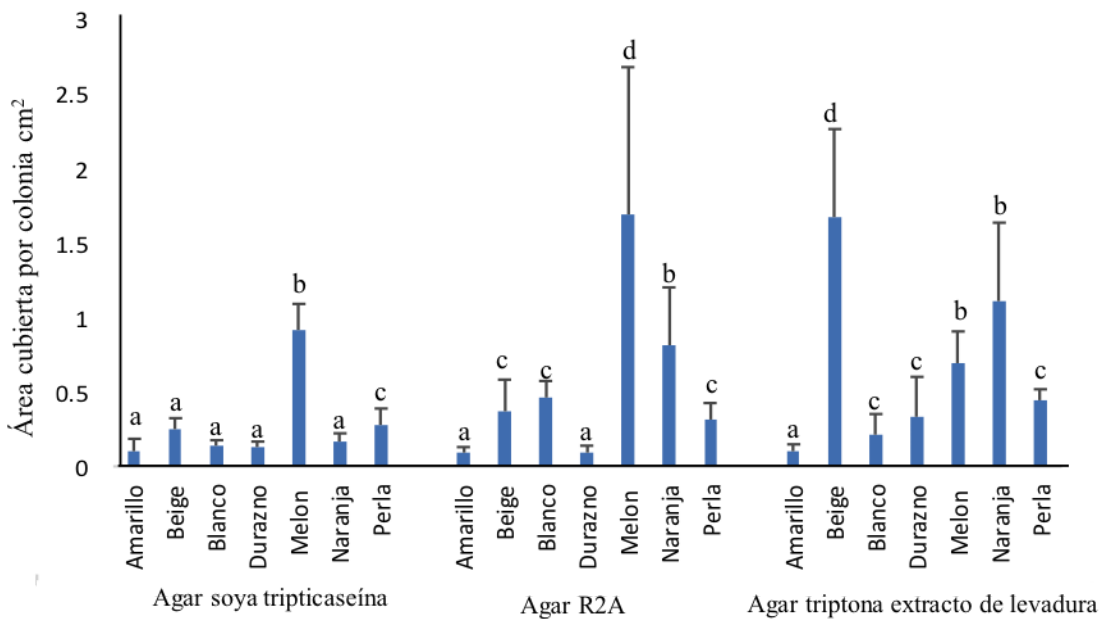


Figura 2 Comparación del área cubierta por colonias con distintos colores en los tres medios de cultivos utilizados. Las letras diferentes indican las medidas que son significativamente diferentes entre los colores de las colonias de acuerdo con la prueba LSM.

Las elevaciones de las colonias bacterianas de la piel de *A. ordinarium* fueron circular, granular, irregular, puntiforme, rizoide. Las elevaciones de crecimiento con mayor área fueron la plana en agar triptona extracto de levadura, seguido por la acuminada en el mismo medio, plana en agar soya tripticaseína, y umbilicada en agar R2A ($\chi^2 = 179.24$, g.l. = 9, $P = 0.0001$) (**Figura 3**). Mientras que las elevaciones como convexa, pulvinada y granular se presentaron con una menor área cubierta por colonia.

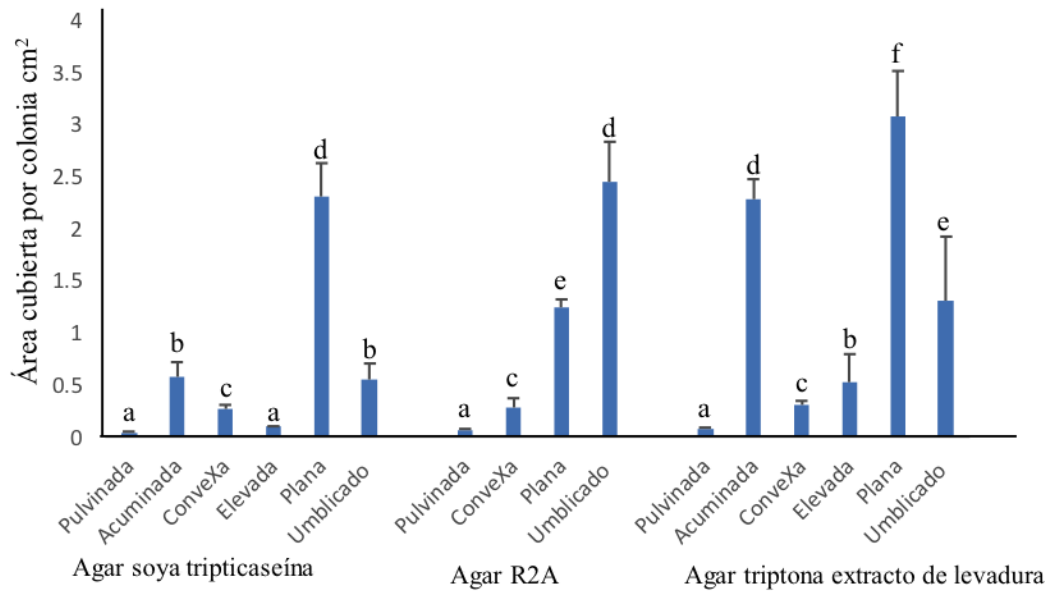


Figura 3 Área cubierta por colonias con distintas elevaciones en los tres medios de cultivos utilizados. Las letras diferentes indican las medidas que son significativamente diferentes entre los colores de las colonias de acuerdo con la prueba LSM.

Las formas de crecimiento encontradas en las colonias bacterianas aisladas de la piel de *A. ordinarium* fueron circular, granular, irregular, puntiforme y rizoide. La forma granular del medio agar triptona extracto de levadura, presentaron la mayor área cubierta por colonia en comparación con el resto de las formas de crecimiento ($X^2= 413.04$, g.l.= 9, $P = 0.0001$) (**Figura 4**).

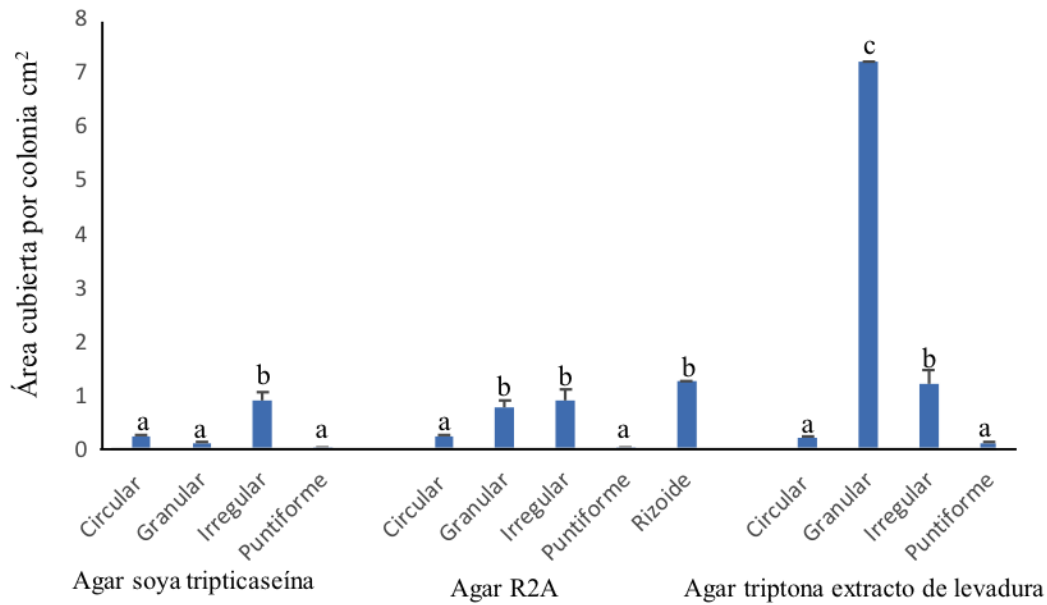


Figura 4 Comparación del área cubierta por colonias con distintas formas de crecimiento en los tres medios de cultivos utilizados. Las letras diferentes indican las medidas que son significativamente diferentes entre los colores de las colonias de acuerdo con la prueba LSM.

Los diferentes tipos de borde descritos en las colonias aisladas de la piel de *A. ordinarium*, son entero, granular, lobulada, ondulado y plano. Los bordes planos y granulares se encontraron únicamente en el medio agar soya tripticaseína. El borde lobulado en agar triptona extracto de agar fue el que presentó mayor área cubierta por colonia, seguido de los borde ondulado y lobulado en agar R2A y agar soya tripticaseína (**Figura 5**). En la **Figura 6** se presenta una imagen del crecimiento de las colonias bacterianas.

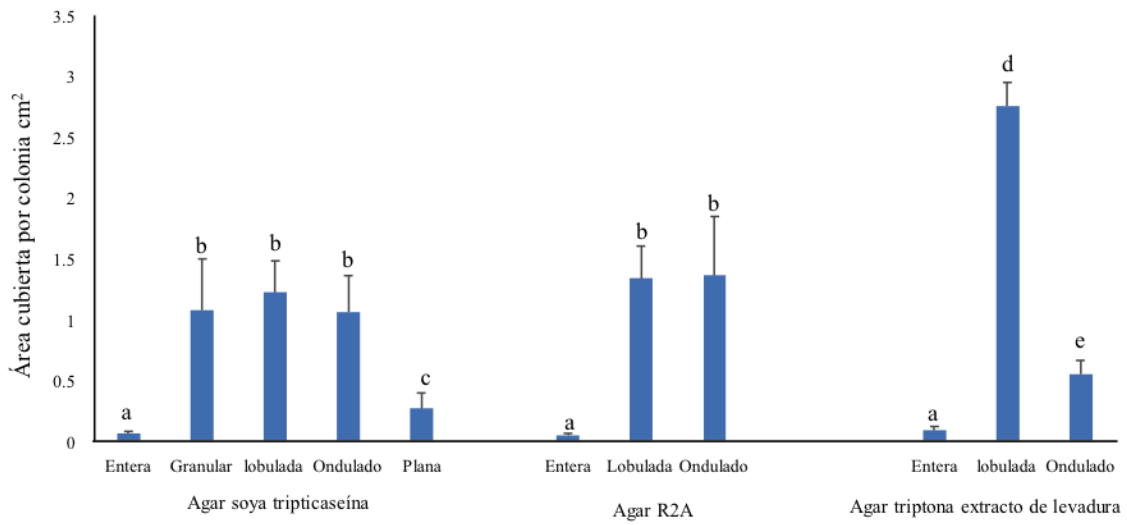


Figura 5 Comparación del área cubierta por colonias con distintos tipos de borde en los tres medios de cultivos utilizados. Las letras diferentes indican las medidas que son significativamente diferentes entre los colores de las colonias de acuerdo con la prueba LSM.

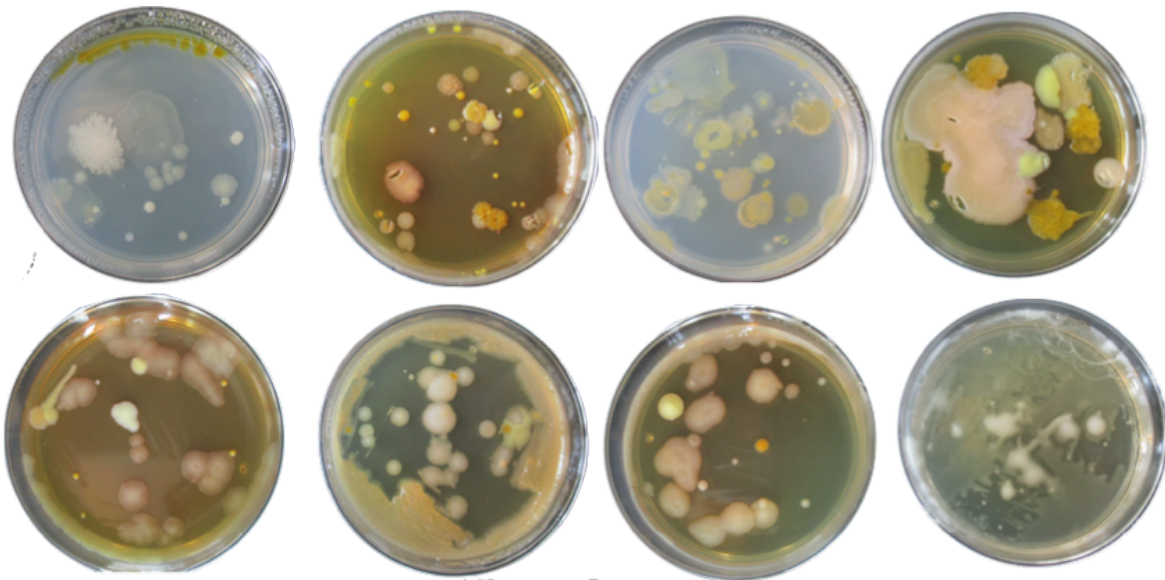


Imagen 3 Colores, formas, y texturas encontradas en los diferentes medios

VI. II Identificación taxonómica de bacterias

Del total de los 106 morfotipos obtenidos de la piel de *A. ordinarium*, sólo 58 fueron secuenciados, debido a que no fue posible extraer ADN de algunos ejemplares y en algunos casos hubo contaminación de la muestra. Se obtuvieron cepas de tres fila: el filo Actinobacteria fue representado por el género *Microbacterium*, el filo Firmicutes se encontró representando en tres géneros *Bacillus*, *Lysinibacillus* y *Staphylococcus*, mientras que el filo Proteobacteria se encontró con un mayor número de géneros como *Acidovorax*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Morganella*, *Novosphingobium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* y *Sphingomonas*. Estos géneros se agruparon en 10 familias y un total de 13 géneros (**Tabla 1**).

Tabla 2 Identificación taxonómica de bacterias asociadas a *A. ordinarium*. Se muestra el número de identificación y número de accesoión identificado

Filum	Familia	Especie	# de identificación
Actinobacteria	Microbacteriaceae	<i>Microbacterium sp</i>	314: MN900709.1
		<i>Microbacterium sp.</i>	1239: MT 102977.1
	Bacillaceae	<i>Bacillaceae</i>	511: JX064890.1
		<i>Bacillus sp.</i>	222: NC_006270.3
		<i>Bacillus sp.</i>	223: NC_006270.3
		<i>Bacillus sp.</i>	224: NC_006270.3
		<i>Bacillus sp.</i>	434: MK613086.1
		<i>Bacillus sp.</i>	637:
			NZ_LSAZ01000028.1
		<i>Bacillus sp.</i>	711: NZ_CP015506.1
		<i>Bacillus sp.</i>	811: MT197315.1
		<i>Bacillus sp.</i>	911: KM502964.1
		<i>Bacillus sp.</i>	925:
			NZ_LSAZ01000028.1
		<i>Bacillus sp.</i>	1011:
	NZ_LSAZ01000028.1		






Firmicutes	<i>Bacillus sp.</i>	1134: NZ_LSAZ01000028.1
	<i>Bacillus sp.</i>	1138: NZ_LSAZ01000028.1
	<i>Bacillus sp.</i>	9327: NZ_CP040344.1
	<i>Bacillus sp.</i>	423: MK613086.1
	<i>Bacillus sp.</i>	514: NC_022781.1
	<i>Bacillus sp.</i>	512: FJ463650.1
	<i>B. aryabhatai</i>	211: MH261178.1
	<i>B. cereus</i>	912: MH130346.1
	<i>B. flexus</i>	517: KT758537.1
	<i>B. licheniformis</i>	9312: MK418380.1
	<i>B. licheniformis</i>	1111: MK603131.1
	<i>B. licheniformis</i>	1211: MT192715.1
	<i>B. nakamurai</i>	1223: MK554504.1
	<i>B. subtilis</i>	1133: MK575023.1
	<i>B. thuringiensis</i>	1331: MN135296.1
	<i>B. wiedmannii</i>	515: MN803228.1
	<i>B. wiedmannii</i>	1033: LC515603.1
	<i>B. wiedmannii</i>	1137: LC515603.1
	<i>B. wiedmannii</i>	1034: LC515603.1
	Planococcaceae	<i>Lysinibacillus sp.</i>
	<i>L. magniferihumi</i>	518: MN335312.1
Staphylococcaceae	<i>S. epidermidis</i>	3310: KX454061.1
e	<i>S. vitinius</i>	725: KX246684.1
	<i>S. epidermidis</i>	132: MN889374.1
Comamonadaceae	<i>Acidovorax sp.</i>	1112: NZ_AFBG01000030.1
e		
Enterobacteriaceae	<i>C. freundii</i>	712: MH668092.1
e		
	<i>Enterobacter hormaechei</i>	422: NZ_CP017179.1
	<i>Enterobacteriaceae bacterium</i>	636: JX162076.1
	<i>Enterobacteriaceae bacterium</i>	639: JX162076.1
	<i>H. alvei</i>	421: DQ412565.1
	<i>H. alvei</i>	624: KX674363.1
	<i>H. alvei</i>	625: DQ412565.1
	<i>Hafnia sp.</i>	611: MH669181.1
	<i>Hafnia sp.</i>	638: MH669181.1
	<i>Hafnia sp.</i>	6310: MH669181.1
	<i>Hafnia sp.</i>	623: NZ_CP014031.2
Proteobacteria	<i>Morganella sp.</i>	737: NC_020418.1























Sphingomonadaceae	<i>Novosphingobium sp.</i>	312: NZ_ATHL01000125.1
	<i>Sphingomonas sp.</i>	612: MN811062.1
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas sp.</i>	135: AB548850.1
	<i>Pseudomonas sp.</i>	833: KR013205.1
	<i>P. alcaligenes</i>	316: JX501351.1
	<i>P. stutzeri</i>	326: MN889370.1
	<i>P. stutzeri</i>	327: MN889370.1
Rhizobiaceae	<i>Rhizobium sp</i>	1113: JQ689943.1
	<i>Unclassified</i>	519



















VI. III Tinción de Gram

De los 106 morfotipos, 46 morfotipos bacterianas obtenidas de la piel de *A. ordinarium*, fueron teñidas con la técnica de tinción de Gram, mismos que ya habían sido secuenciados previamente, el resto no fue posible reactivar por la disminución de los tiempos en el laboratorio además de la contaminación de medios de cultivo. De las 46, 25 presentaron forma de Bacilos, cuatro de Cocobacilos y 17 mostraron forma de Coco (**Tabla 2**). En el **Anexo 1** se presentan las imágenes completas de las bacterias.

Tabla 3 Características de las bacterias aisladas de la piel de *A. ordinarium* con la tinción de Gram.

# identificación: LOCUS	Bacteria	Tamaño (μ)	Gram (+ ó -)	Forma	Agrupación	
132: MN889374.1	<i>S. epidermidis</i>	0.817	Gram positivo	Coco	Estafilococos	
135: AB548850.1	<i>Pseudomonas sp.</i>	1.052	Gram negativos	Cocobacilos	Estreptococos	
211: NZ_CP024037.1	<i>B. aryabhatai</i>	5.914	Gram negativos	Bacilos	Estreptobacilos	
314: MN900709.1	<i>Microbacterium sp.</i>	1.736	Gram negativos	Cocobacilos	Estreptobacilos	
316: JX501351.1	<i>P. alcaligenes</i>	0.286	Gram	Cocobac	Estreptobacil	

			positivo	ilos	os	
326: MN889370.1	<i>P. stutzeri</i>	1.69	Gram negativos	Bacilos	Diplobacilos	
327: MN889370.1	<i>P. stutzeri</i>	0.516	Gram negativos	Coco	Estreptococos	
3310: KX454061.1	<i>S. epidermidis</i>	0.802	Gram positivo	Coco	Estafilococos	
421: DQ412565.1	<i>H. alvei</i>	0.678	Gram negativos	Coco	Estafilococos	
422: NZ_CP017179.1	<i>Enterobacter hormaechei</i>	1.738	Gram positivo	Cocobacilos	Estreptobacilos	
423: NZ_CP026362.1	<i>Bacillus sp</i>	1.394	Gram negativos	Bacilos	Diplobacilos	
511: NC_022781.1	<i>Bacillaceae</i>	3.954	Gram positivo	Bacilos	Estreptobacilos	
512: FJ4636501	<i>Bacillus sp</i>	3.914	Gram positivo	Bacilos	Estreptobacilos	
513: NZ_CP006837.1	<i>Unclassified</i>	3.515	Gram positivo	Bacilos	Estreptobacilos	
514: NC_022781.1	<i>Bacillus sp.</i>	4.337	Gram positivo	Bacilos	Estreptobacilos	
515: MN803228.1	<i>B. wiedmannii</i>	3.779	Gram positivo	Bacilos	Estreptobacilos	
518: MN335312.1	<i>L. magniferihumi</i>	3.813	Gram positivo	Bacilos	Estreptobacilos	
519: sin clasificar	<i>Sin clasificar</i>	3.553	Gram negativos	Bacilos	Estreptobacilos	
611: MH669181.1	<i>Hafnia sp.</i>	0.3714	Gram negativos	Coco	Estreptococos	
612: MN811062.1	<i>Sphingomonas sp.</i>	2.238	Gram negativos	Bacilos	Diplobacilos	
623: NZ_CP014031.2	<i>Enterobacteriaceae</i>	0.5375	Gram negativos	Coco	Estreptococos	
624: KX674363.1	<i>H. alvei</i>	0.452	Gram negativos	Coco	Estafilococos	
625: DQ412565.1	<i>H. alvei</i>	0.514	Gram negativos	Coco	Estreptococos	
636: JX162076.1	<i>Enterobacteriaceae</i>	0.72	Gram negativos	Coco	Estafilococos	
638: MH669181.1	<i>Hafnia sp.</i>	0.251	Gram negativos	Coco	Estreptococos	
639: JX162076.1	<i>Enterobacteriaceae</i>	0.386	Gram negativos	Coco	Estreptococos	
6310: MH669181.1	<i>Hafnia sp.</i>	0.795	Gram negativos	Coco	Estreptococos	

712: MH668092.1	<i>C. freundii</i>	0.519	Gram negativos	Cocobacilos	Estreptobacilos	
725: KX246684.1	<i>S. vitinius</i>	0.563	Gram positivo	Coco	Estafilococos	
811: MT197315.1	<i>Bacillus sp.</i>	0.63	Gram negativos	Coco	Estafilococos	
833: KR013205.1	<i>Pseudomonas sp.</i>	1.724	Gram negativos	Bacilos	Estreptobacilos	
911: KM502964.1	<i>Bacillus sp.</i>	4.261	Gram positivo	Bacilos	Estreptobacilos	
912: MH130346.1	<i>B. cereus</i>	3.215	Gram positivo	Bacilos	Estreptobacilos	
9312: MK418380.1	<i>B. licheniformis</i>	0.819	Gram positivo	Bacilos	Estreptobacilos	
1033: LC515603.1	<i>B. wiedmannii</i>	3.475	Gram positivo	Bacilos	Estreptobacilos	
1034: LC515603.1	<i>B. wiedmannii</i>	3.398	Gram positivo	Bacilos	Diplobacilos	
1111: MK603131.1	<i>B.licheninformis</i>	0.454	Gram positivo	Coco	Estreptococos	
1113: JQ689943.1	<i>Rhizobium sp.</i>	1.763	Gram negativos	Bacilos	Estreptobacilos	
1133: MK575023.1	<i>B. subtilis</i>	5.516	Gram negativos	Bacilos	Diplobacilos	
1137: LC515603.1	<i>B. wiedmannii</i>	3.944	Gram positivo	Bacilos	Estreptobacilos	
1211: MT192715.1	<i>Bacillus sp.</i>	0.903	Gram positivo	Coco	Estafilococos	
1223: MK554504.1	<i>B. licheniformis</i>	1.269	Gram positivo	Bacilos	Estreptobacilos	
1227: sin clasificar	-	3.501	Gram positivo	Bacilos	Estreptobacilos	
1239: MT102977.1	<i>Microbacteriaceae</i>	0.604	Gram positivo	Bacilos	Estreptobacilos	
1331: NC_022781.1	<i>Bacillus sp.</i>	4.396	Gram positivo	Bacilos	Estreptobacilos	

VI. IV Biopelículas y movilidad por swarming.

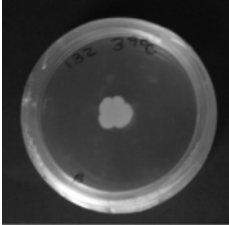
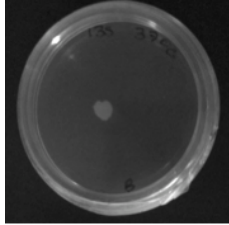
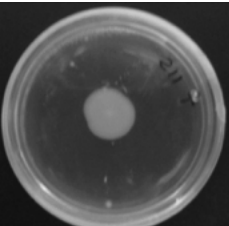
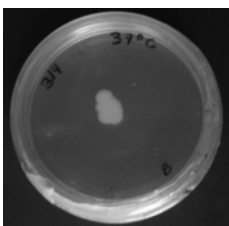
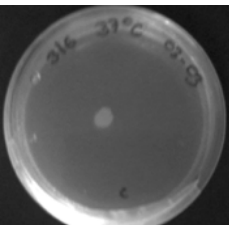
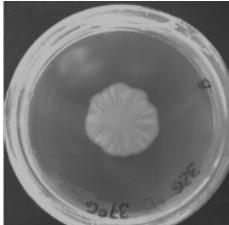
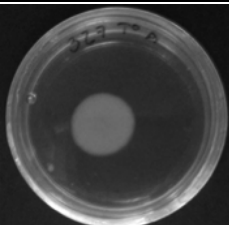
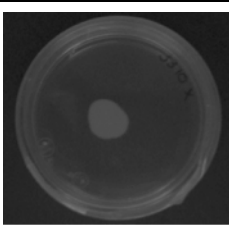
Respecto a la movilidad por swarming, se utilizaron las mismas bacterias que en la tinción de Gram, las 46 bacterias solo 34 presentaron movilidad por swarming. Los

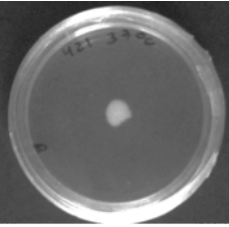
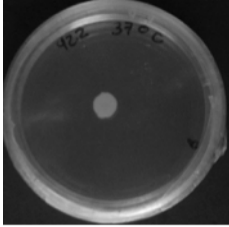

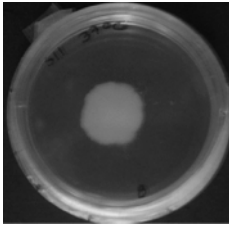
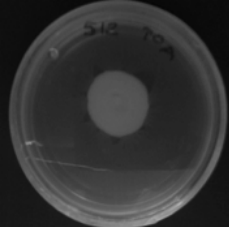
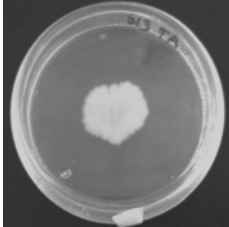

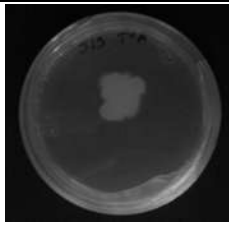
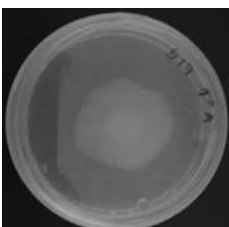
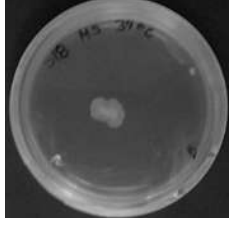
resultados muestran que las bacterias se movilizan hacia afuera del inóculo inicial, en 34 de las 46 cepas analizadas, mostraron un desplazamiento mayor a los 0.5 mm del inóculo (**Tabla 4**).

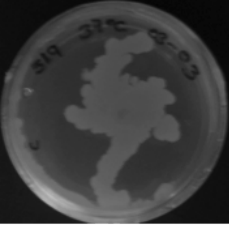
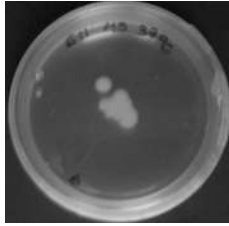

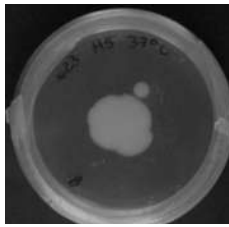
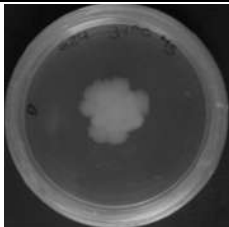

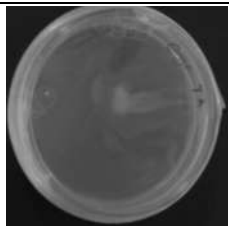
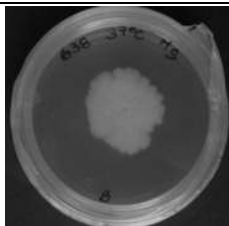
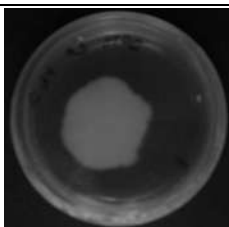
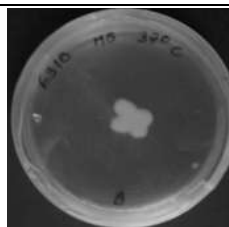
Los resultados obtenidos por Aneli Vanessa Flores, en su tesina "Evaluación de la capacidad de formación de biopelículas en bacterias de la piel aisladas de los ajolotes *A. altamirani* (Dugés, 1895) y *A. ordinarium* (Taylor, 1940)", del laboratorio de Biología de Sistemas y Biología Sintética, del Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM, muestran que del total de 45 cepas analizadas, 21 no mostraron formación de biopelículas, de acuerdo con el valor de densidad óptica (DO), donde 0 significa que no hay producción de biopelícula, 1 que la producción es débil, 2 que la biopelícula es moderada y 3 que la biopelícula es fuerte. Dentro de la categoría 0 se agruparon 11 cepas (*Bacillus sp.*, *B. aryabhattai*, *B. cereus*, *B. flexus*, *B. nakamurai*, *B. wiedmannii*, *Enterobacter hormaechei*, *Lysinibacillus magniferihumi*, *Microbacteriaceae*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Staphylococcus epidermidis*, *S. vitinius*, *Rhizobium sp.*), encontrando en algunos casos formación de biopelículas en el cultivo, pero no en placa. Diez cepas mostraron formación de biopelículas débil en la categoría 1 (*Bacillus sp.*, *B. licheniformis*, *C. freundii*, *Hafnia alvei*, *Pseudomonas sp.*, *P. stutzeri*, *S. epidermidis*), 10 cepas formaron biopelículas de manera moderada correspondiente a la categoría 2 (*Enterobacteriaceae*, *Hafnia sp.*, *H. alvei*, *Microbacterium sp.*) y 4 forman biopelículas fuertes, pertenecientes a la categoría 3 (*B. subtilis*, *B. licheniformis*, *Pseudomonas sp.*, *Sphingomonas sp.*) y en una cepa no fue posible determinar el nivel de formación de película debido a que se pierde con los

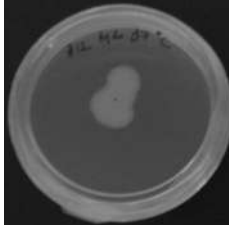
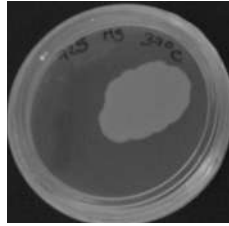
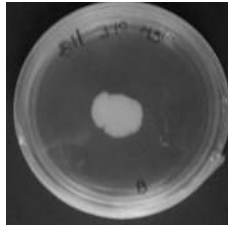
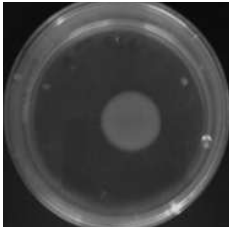
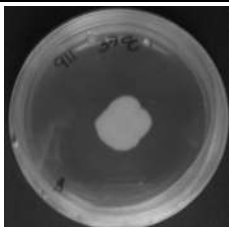
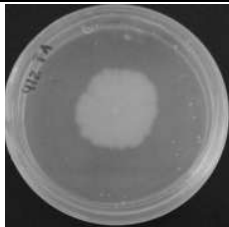
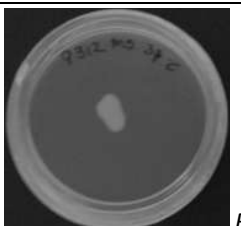
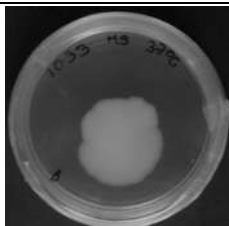
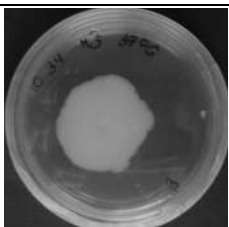
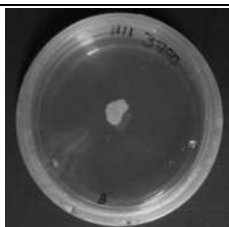
lavados. De las 46 cepas analizadas sólo 16 presentaron formación de biopelícula y movilidad por swarming (*Pseudomonas* sp., *P. stutzeri*, *Bacillus* sp., *B. subtilis*)

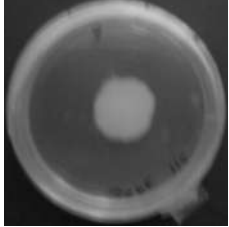
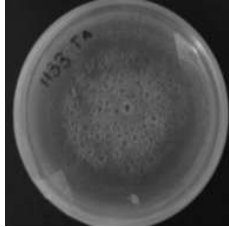
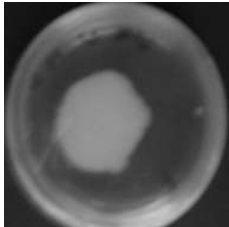
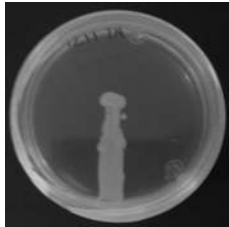
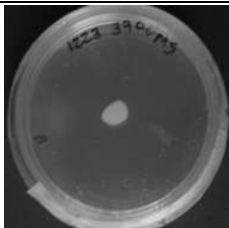
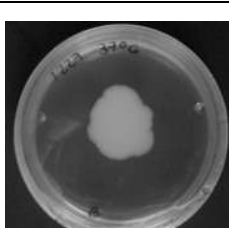
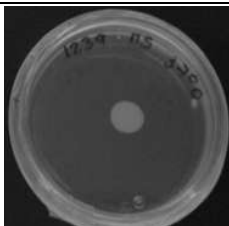
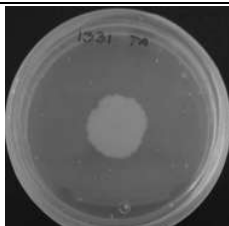
Tabla 4 Movilidad por swarming de las bacterias cultivables de la piel de *A. ordinarium*

Especie # Locus	Swar ming	Diámetro	Especie # Locus	Swar ming	Diámetro
 <i>S. epidermis</i> 132: MN8893741	Si	0.5960	 <i>Pseudomonas</i> sp. 135: AB548850.1	-	0.3380
 <i>B. aryabhatai</i> 211: NZ_CP024037.1	Si	0.7010	 <i>Microbacterium</i> sp. 314: MN900709.1	-	0.4890
 <i>P. alcaligenes</i> 316: JX501351.1	-	0.2525	 <i>P. stutzeri</i> 326: MN889370.1	Si	0.8695
 <i>P. stutzeri</i> 327: MN889370.1	Si	0.8940	 <i>S. epidermidis</i> 3310: KX454061.1	Si	0.6130

 <p><i>H. alvei</i> 421: DQ412565.1</p>	-	0.3730	 <p><i>Enterobacter hormaechei</i> 422: NZ_CP017179.1</p>	-	0.3505
 <p><i>Bacillus</i> sp 423: NZ_CP026362.1</p>	-	0.3715	 <p>Bacillaceae 511: NC_022781.1</p>	Si	0.8735
 <p><i>Bacillus</i> sp 512: FJ4636501</p>	Si	1.271	 <p>Unclassified 513: NZ_CP006837.1</p>	Si	0.8555
 <p><i>Bacillus</i> sp. 514: NC_022781.1</p>	Si	0.5600	 <p><i>B. wiedmannii</i> 515: MN803228.1</p>	Si	0.9210
 <p><i>B. flexis</i> 517 KT58537.1</p>	Si	1.23685	 <p><i>L. magniferihumi</i> 518: MN335312.1</p>	Si	0.5145

 <i>Sin clasificar 519: sin clasificar</i>	Si	1.4217	 <i>Hafnia sp. 611: MH669181.1</i>	Si	0.5460
 <i>Spingomonas sp. 612: MN811062.1</i>	-	0.1845	 <i>Enterobacteriaceae 623: NZ_CP014031.2</i>	Si	0.8675
 <i>H. alvei 624: KX674363.1</i>	Si	1.2145	 <i>H. alvei 625: DQ412565.1</i>	Si	0.8300
 <i>Enterobacteriaceae 636: JX162076.1</i>	Si	1.229	 <i>Hafnia sp. 638: MH669181.1</i>	Si	0.7385
 <i>Enterobacteriaceae 639: JX162076.1</i>	Si	1.2355	 <i>Hafnia sp. 6310: MH669181.1</i>	Si	0.5380

 <i>C. freundii</i> 712: MH668092.1	Si	0.6235	 <i>S. vitinius</i> 725: KX246684.1	Si	0.9970
 <i>Bacillus</i> sp. 811: MT197315.1	-i	0.4485	 <i>Pseudomonas</i> sp. 833: KR013205.1	Si	0.7615
 <i>Bacillus</i> sp. 911: KM502964.1	Si	0.7580	 <i>B. cereus</i> 912: MH130346.1	Si	1.0980
 <i>B. licheniformis</i> 9312: MK418380.1	-	4.5730	 <i>B. wiedmannii</i> 1033: LC515603.1	Si	0.8570
 <i>B. wiedmannii</i> 1034: LC515603.1	Si	1.2750	 <i>B. licheniformis</i> 1111: MK603131.1	-	0.3330

	Si	0.861		Si	1.5210
<i>Rhizobium sp. 1113: JQ689943.1</i>			<i>B. subtilis 1133: MK575023.1</i>		
	Si	1.3250		-	0.3320
<i>B. wiedmannii 1137: LC515603.1</i>			<i>Bacillus sp. 1211: MT192715.1</i>		
	-	0.3675		Si	1.0655
<i>B. licheniformis 1223: MK554504.1</i>			<i>1227: sin clasificar</i>		
	Si	0.8647		Si	0.8015
<i>Microbacteriaceae 1239: MT102977.1</i>			<i>Bacillus sp. 1331: NC_022781.1</i>		

VI.V Relaciones Filogenéticas

Los resultados obtenidos con el marcador 16S rRNA de 58 secuencias de ADN con una longitud del alineamiento de 911 pares de bases, dieron como resultado un árbol bayesiano donde se observaron las relaciones entre las secuencias del gen 16S

rRNA provenientes de diferentes cepas bacterianas (**Figura 6**). El clado de los Firmicutes (Bacillaceae, Planococcaceae, Staphylococcaceae) presentó una probabilidad posterior de 0.75, mientras que el clado del filo Actinobacteria (Microbacteriaceae) y Proteobacteria (Comamonadaceae, Enterobacteriaceae, Sphingomonadaceae, Pseudomonadaceae, Rhizobiaceae) se agruparon con una probabilidad posterior de 1.

Las bacterias Gram positivo se agrupan mayormente en la familia Bacillaceae, mientras que las Gram negativas se distribuyeron a lo largo de la filogenia. En lo que respecta a la formación de Biopelícula el 80% de las bacterias examinadas de la familia Pseudomonadaceae presentaron esta estrategia, seguida por la familia Enterobacteriaceae y en tercer lugar la familia Bacillaceae. La movilidad por swarming fue más representativa en la familia Enterobacteriaceae seguida por la familia Bacillaceae y Pseudomonadaceae.

Tree scale: 0.1

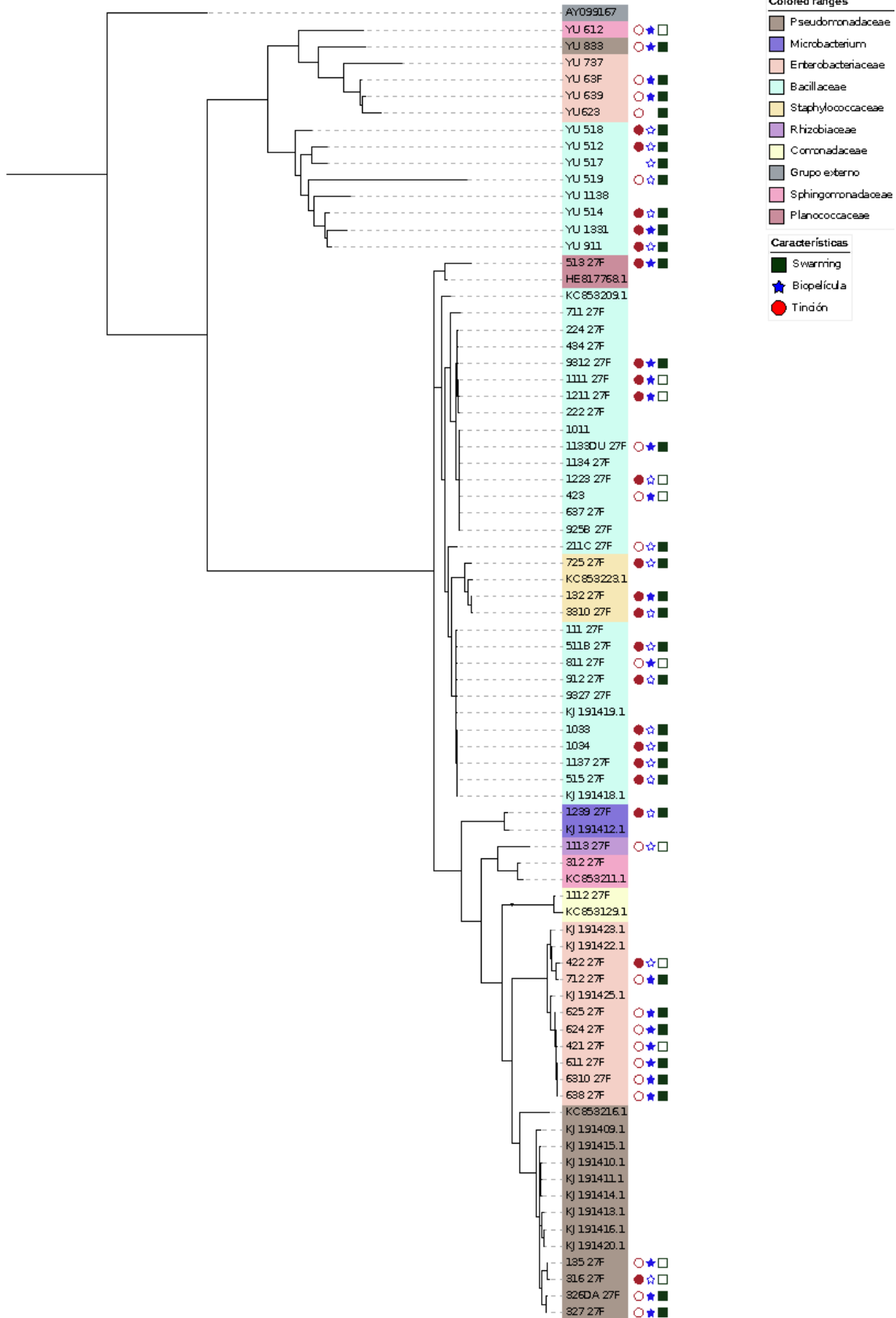


Figura 6 Árbol bayesiano de las bacterias aisladas de la piel de *A. ordinarium* en cautiverio. Los números representan los OTUS de la piel de *A. ordinarium* en cautiverio: *B. wiedmannii* (1033, 1034, 1137, 515), *Bacillaceae* (511), *Bacillus sp.* (512, 1138, 514, 911, 111, 811, 9327, 101, 1134, 423, 637, 925, 222, 224, 434, 711, 211), *B. flexus* (517), *B. thuringiensis* (1331), *B. cereus* (912), *B. subtilis* (1133), *B. nakamurai* (1223), *B. licheniformis* (1111,1211, 9312), *Sphingomonas sp.* (612) *Morganella sp.*(737), *Enterobacteriaceae* (63, 639) *Lysinibacillus sp.* (518), Sin clasificar (519), *S. epidermidis* (132, 3310), *S. vitinius* (725), *Acidovorax sp.* (1112), *Pseudomonas sp.* (823, 135), *P. alcaligenes* (316), *P. stutzeri* (326, 327), *H. alvei* (421, 624, 625), *Hafnia sp.* (623, 611, 6310, 638), *E. hormaechei* (422), *C. freundii* (712), *Rhizobium sp.* (1113), *Novosphingobium sp.* (312), *Microbacterium sp.* (1239). El número AY099167 es una especie del género *Pyrococcus* que fue usada como grupo externo y el resto son secuencias tomadas de la base de Woodhams et al., (2015). La tinción de Gram se encuentra representada por un círculo vacío cuando es negativa y relleno cuando es positiva, la estrella y los cuadros vacíos son falta de formación de biopelícula o swarming dependiendo sea el caso.

VII. DISCUSIÓN

En nuestro estudio encontramos bacterias cultivables de la piel de *A. ordinarium* como *Bacillus*, *Hafnia*, *Lysinibacillus*, *Microbacterium*, *Rhizobium*, *Staphylococcus*, que no habían sido reportados para el género *Ambystoma*. Otros géneros de bacterias descritos en nuestros resultados coinciden con los reportados por Demircan et al. (2018) y Negrete (1999) para los géneros *Acidovorax*, *Citrobacter*, *Pseudomonas*, *Enterobacter* y *Aeromonas* reportados para *A. mexicanum*. Se encontraron coincidencias en cuatro familias de bacterias, *Comamonadaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Sphingomonadaceae*, *Pseudomonadaceae*, con las descritas para *A. tigrinum* (Mckenzie et al., 2012).

Como diversos autores han descrito, la comunidad bacteriana de las especies actúa como controlador biológico de patógenos (Ezziymani, et al 2006) como *Bd* (Shaw et al., 2014. Muletz et al., 2017). Géneros particulares de bacterias como *Arthrobacter*, *Pedobacter* y *Pseudomonas* han sido aislados en salamandras, proporcionando resultados exitosos en la inhibición del *Bd* a través de ensayos in vitro (Harris et al. 2006). Específicamente las cepas del género *Pseudomonas* son residentes comunes de la microbiota de la piel de otros anfibios como las ranas

Atelopus spurrelli (Woodhams et al., 2014), *A. elegans*, *A. aff. limosus* (Flechas et al., 2012), *G. riobambae* (Bresciano et al., 2015), *Boana prasina* (Brunetti et al., 2018), y *Rana mucosa* (Myers et al., 2012). Los aislados pertenecientes al género *Pseudomonas* de estas especies de anfibios como *P. aeruginosa*, *P. fulva*, *P. geniculata*, *P. mosselii*, *P.s putida*, *P. veronii*, *P. vranovensis* (Flechas et al., 2012) *P. fluorescens* (Myers et al., 2012, Bresciano et al., 2015), han mostrado en diversos estudios la inhibición del crecimiento de *Bd* en ensayos de laboratorio. De manera similar, *B. subtilis* es también considerada como bacteria con capacidad probiótica que ha sido reportada y utilizada previamente en distintos anfibios (Franca et al., 2008 y Freitas et al. 2017). En ensayos de laboratorio de especies de *B.* obtenidos de la piel de *P. cinereus*, mostraron inhibición del desarrollo de *Bd* (Harris et al., 2006). Adicional a esto, en la base de datos de aislados bacterianos de la piel de anfibios de Woodhams et al., (2015) se han reportado especies de *Bacillus* en los anfibios como *Rana muscosa*, *P. cinereus*, *Mantidactylus betsileanus*, *Litorianan notis*, *Craugastor crassidigitus*, *Bufo typhonius*, *A. limosus*, *Hemidactylus scutatatum*, con capacidad para inhibir *Bd*.

Otros géneros con capacidad para inhibir *Bd*, se encuentran reportados en la base de datos de Woodhams et al., (2015), algunos de estos géneros coinciden con los obtenidos de la piel de *A. ordinarium* como; *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Lysinibacillus*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Novosphingobium*, *Rhizobium*, *Sphingomonas*, *Staphylococcus*. De acuerdo con la base de datos de Woodhams et al., (2015) estas bacterias han sido reportadas en anfibios de las familias *Aromobatidae*, *Bufo*, *Centrolenidae*, *Craugastoridae*, *Dendrobatidae*, *Hylidae*,

Mentellidae, *Plethodontidae* y *Ranidae*, la mayoría de hábitats tropicales excepto *A. boreas* la cual se distribuye en altitudes superiores a los a los 2400 msnm.

Aunque las bacterias son organismos unicelulares, pueden mostrar un comportamiento grupal como es la formación de biopelículas (O'toole et al., 2000), que se logra a través del mecanismo quorum sensing. El quorum sensing es un atributo de muchas especies bacterianas que les dota de la capacidad de comunicarse entre ellas por medio de moléculas-señal, las cuales son secretadas al ambiente, y la concentración de estos compuestos químicos depende de la densidad de la población (Fuqua y Greenberg, 2002). Este proceso es suficiente para que las bacterias inicien la expresión coordinada de genes específicos, que conduce a patrones de comportamiento coordinado (Shapiro 1998, March and Bentley, 2004).

La capacidad de formación de biopelículas ha sido muy poco explorada en la microbiota de anfibios, a pesar de que algunos autores han sugerido que esta propiedad emergente de las comunidades bacterianas es de gran importancia en el diseño de probióticos como tratamientos contra enfermedades infecciosas (Piovia-Scott et al. 2017). El estudio realizado por Aneli Flores en el Laboratorio de Biología de Sistemas y Biología Sintética en el Centro de Ciencias Genómicas UNAM, con las cepas de *A. ordinarium* del presente proyecto, encontraron que diversas cepas producen biopelículas, como *S. epidermidis*, *Pseudomonas sp.*, *P. stutzeri*, *Microbacterium sp.*, *H. alvei*, *Hafnia sp.*, *Bacillus sp.*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. thuringiensis*, *Sphingomonas sp.* *Enterobacteriaceae bacterium* y *C. freundii*.

Rebollar et al. (2018) ha reportado para los géneros de bacterias *Mycobacterium*, *Pseudomonas* y *Staphylococcus* de la piel de *C. fitzingeri*, varios genes involucrados en la formación de biopelículas, así como la comunicación por quorum sensing. En otros sistemas biológicos, especies de los géneros de *Pseudomonas* y *Acinetobacter* pueden formar biopelículas que proporcionan estructura y protección a las comunidades bacterianas (Drenkard y Ausubel, 2002, Wei y Ma, 2013. Longo et al., 2014).

Algunas bacterias descritas en nuestros resultados, tienen un alto porcentaje de similitud con patógenos de importancia médica formadores de biopelículas como *S. epidermidis* (Jamal et al., 2018). Sin embargo, éstas bacterias han sido reportadas como microbiota normal de anfibios como la rana toro norteamericana, *Lithobates catesbeianus* en cautiverio incluye *C. freundii*, *Enterobacter spp.*, *S. epidermidis*, *Bacillus sp.*, (Niederle et al., 2019) El género *Microbacterium* ha sido aislado y descrita su capacidad de formación de biopelículas en diversos sistemas como cultivos agrícolas (Dees et al. 2017) como en corrientes de agua (Tang et al. 2013). Las bacterias del género *Hafnia* son anaerobias facultativas Gram-negativas, con producción de biopelículas, que en humanos causa bacteriemia e infecciones intestinales (Podschun et al., 2001, Crandall et al., 2006) y en otras especies animales causan lesiones septicémicas (Real et al., 1997, Vivas et al., 2008). La bacteria *C. freundii* es un patógeno bacteriano oportunista asociado a dermatosepticemia bacteriana causando una enfermedad infecciosa en las ranas (Schadich et al., 2009). Para el género *Sphingomonas*, se ha descrito la formación de biopelículas en *S.*

paucimobilis (Gusman et al., 2012), como contaminante de agua para consumo humano.

Para las bacterias patógenas, la producción de biopelículas es un factor de virulencia al conferir resistencia a los agentes bactericidas (Rasmussen-Ivey et al. 2016) y adherirse a las células huésped, característico de la primera etapa del proceso de infección (Dias et al. 2018). Sin embargo, la producción de biopelículas (Ringo et al. 2010, Sánchez-Ortíz et al 2015) al ser una propiedad que les permite a las bacterias adherirse firmemente a las superficies o a las células vecinas (Flemming y Wingender 2010, Soto y Hultgren, 1999).

Bd es un patógeno queratinofílico (Berger et al. 2005) que debe atravesar la barrera mucosa para llegar a las capas epidérmicas externas. Sin embargo, si las bacterias de la piel del anfibio son productoras de biopelículas, es altamente probable que inhiban las infecciones por este hongo (Piovia-Scott et al. 2017). Por lo tanto, la presencia de estas cepas bacterianas productoras de biopelículas en la piel de individuos de *A. ordinarium* en cautiverio, proporcionan protección contra patógenos.

Además, las células de biopelículas no son estáticas ya que muchos microorganismos muestran movilidad sobre una superficie, como es la movilidad por swarming (Shrout et al. 2006, Wang et al. 2004), durante la etapa final de separación y dispersión de la formación de biopelículas (Jamal et al., 2018). Aunque la formación de biopelículas son las formas de expresión más ampliamente distribuidas del comportamiento colectivo de las bacterias, el swarming es una de las formas que las bacterias pueden manifestar, similar a un tejido (Morris y Monier, 2003). El swarming

es regulado, al igual que las biopelículas, por quorum sensing (Whitehead et al. 2001) y es un movimiento impulsado por flagelos en presencia de limo extracelular, que es una mezcla de carbohidratos, proteínas, péptidos, tensioactivos, principalmente (Fraser y Hughes 1999). La capacidad de swarming se ha descrito en bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, incluidas *Aeromonas*, *Burkholderia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia*, *Vibrio*, *Yersinia*, *Bacillus* y *Clostridium* (Fraser y Hughes, 1999, Harshey, 2003, Kearns y Losick, 2003, Macfarlane et al., 2001, Senesi et al., 2002, 2004, Verstraeten et al., 2008).

En una revisión sobre el fenómeno bacteriano de movilidad por swarming, describen que es una característica estrechamente conservada en el dominio bacteriano y actualmente está restringido a tres familias, Alphaproteobacteria (*Sphingomonas*), Gammaproteobacteria (*Pseudomonas*), y Firmicutes (*B. subtilis*, *B. thuringiensis*, *B. cereus*) (Kearns et al. 2010). Principalmente el género *Bacillus* se caracteriza por la movilidad por swarming, por ejemplo, *B. subtilis* expanden sus colonias por swarming en una amplia gama de medios de cultivo (Jeckel et al., 2019) al igual que *B. cereus* (Ghelardi et al. 2007). La producción de biopelículas de *Pseudomonas stutzeri* ha sido reportada como un mecanismo de resistencia al mercurio, en estudios experimentales (Zheng et al. 2018). En nuestro estudio, *Pseudomonas sp.*, *P. stutzeri*, *Bacillus sp.*, *B. subtilis* y *B. thuringiensis* mostraron ambas características, producción de biopelículas y swarming, lo que las coloca como cepas bacterianas de la piel de *A. ordinarium* en cautiverio, con capacidades de protección contra patógenos.

La tinción Gram es una técnica que permite la clasificación de las bacterias de acuerdo con sus morfologías y por su pared celular, siendo consideradas las

Gram-negativas de mayor virulencia (Thairu et al., 2014, Boyanova et al., 2017). Bacterias Gram negativas como *P. putida*, y *P. fluorescens* son consideradas oportunistas y pueden llegar a causar lesiones cutáneas en la piel de *A. mexicanum*. En nuestro estudio identificamos 23 cepas (50%) de la piel de *A. ordinarium*, como Gram-negativas. Aunque en nuestro estudio no analizamos producción de péptidos u otro metabolito de defensa en la piel de *A. ordinarium*, existe la posibilidad de que estas cepas Gram-negativas tengan la capacidad de producir esta defensa química debido a que el metabolito secundario 2,4-diacetilfloro-glucinol es producido por la bacteria gram negativa *P. fluorescens*, aislada de la piel de la *R. mucosa* (Myers et al., 2012) con capacidad de inhibir el crecimiento de *Bd*, así mismo aislados de *Bacillus sp.*, de la piel de *P. cinereus* produce un metabolito denominado triptofol (Loudon et al., 2014)

El patrón general de diversidad de la microbiota en la piel de los anfibios en cautiverio, ha sido asociado a la disminución de esta diversidad en comparación con especies de vida silvestre (Becker et al., 2014, Loudon et al., 2014, Bataille et al., 2015, Kueneman et al., 2016, Sabino-Pinto et al., 2016), haciendo que los individuos sean más susceptibles a la infección por patógenos (Sabino-Pinto et al. 2016). Sin embargo, algunos autores describen que a pesar de que las comunidades microbianas asociadas a anfibios pueden ser alteradas en condiciones de cautiverio, la mayor parte de la estructura de la comunidad puede ser preservada (Becker et al., 2014). Aunque en nuestro estudio no comparamos microbiota de piel de individuos de *A. ordinarium* en cautiverio y vida libre, sí pudimos constatar la presencia de cepas que taxonómicamente coinciden con cepas que inhiben el crecimiento de patógenos.

De nuestros resultados destaca la importancia de estudiar la microbiota de la piel de anfibios por técnicas de cultivo y aislamientos individual de bacterias, donde es posible identificar géneros con características microbianas, como la actividad anti-*Bd* y propiedades que le permiten a la bacteria adherirse y colonizar como la formación de biopelículas y el swarming (Piovia-Scott et al. 2017). De esta manera, la selección de la microbiota adecuada juega un papel fundamental en el tratamiento contra patógenos (Bletz et al., 2013, Woodhams et al., 2016).

Sin embargo, son pocos los estudios que han investigado en cautiverio la diversidad de la microbiota en la piel de los anfibios (Becker et al., 2014; Loudon et al., 2014, Sabino-Pinto et al., 2016), a pesar del potencial uso de las bacterias para técnicas de bioaumentación (Bletz et al., 2013) para el control de patógenos como *Bd*.

VIII. CONCLUSIÓN

Las bacterias cultivables asociadas a la piel de *A. ordinarium* se distribuyeron en tres fila, Actinobacteria, Proteobacteria, y Firmicutes, que han sido documentadas con capacidad anti-*Bd* en otros sistemas de estudio. Las bacterias simbióticas de *A. ordinarium* presentan movilidad por el swarming y crecimiento en forma de biopelículas, lo cual es de gran importancia biológica para el anfibio, ya que estas características podrían brindar la capacidad de protección contra patógenos causantes de enfermedades infecciosas.

IX. BIBLIOGRAFÍA

Aguilar-Miguel, X., Legorreta B., G., Casas-Andreu, G., 2009. Reproducción ex situ en

- Ambystoma Granulosum y Ambystoma Lermaense (Amphibia: Ambystomatidae). AZM 25. <https://doi.org/10.21829/azm.2009.253652>
- Alan Pounds, J., Bustamante, M.R., Coloma, L.A., Consuegra, J.A., Fogden, M.P.L., Foster, P.N., La Marca, E., Masters, K.L., Merino-Viteri, A., Puschendorf, R., Ron, S.R., Sánchez-Azofeifa, G.A., Still, C.J., Young, B.E., 2006. Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. *Nature* 439, 161–167. <https://doi.org/10.1038/nature04246>
- Alvarado-Díaz J, Suazo-Ortuño I, Wilson LD, Medina-Aguilar O. 2013. Patterns of physiographic distribution and conservation status of the herpetofauna of Michoacán, Mexico. *Amphibian & Reptile Conservation* 7(1): 128–170(e71).
- Alvarado, J.P. G., Suazo I., 2003. Food habits of a paedomorphic population of the Mexican salamander, *Ambystoma ordinarium* (Caudata:Ambystomatidae). *The Southwestern Naturalist* 48: 100-102
- Anderson, J.D. Worthington R.D., 1971. The life history of the Mexican salamander *Ambystoma ordinarium* Taylor *Herpetologica* 27:165-176
- Andreu, G.C., Aviña, R.C., 2004. Un regalo poco conocido de México al mundo: el ajolote o axolotl *C I E N C I A* 10, 3.
- Antwis, R.E., Harrison, X.A., 2018. Probiotic consortia are not uniformly effective against different amphibian chytrid pathogen isolates. *Mol Ecol* 27, 577–589. <https://doi.org/10.1111/mec.14456>
- Antwis, R.E., Haworth, R.L., Engelmoer, 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 callidryas*). *PLoS ONE* 9, e85563. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085563>
- Antwis, R.E., Preziosi, R.F., Harrison, X.A., Garner, T.W.J., 2015. Amphibian Symbiotic Bacteria Do Not Show a Universal Ability To Inhibit Growth of the Global Panzootic Lineage of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 3706–3711. <https://doi.org/10.1128/AEM.00010-15>
- Apponyi, M.A., Pukala, T.L., Brinkworth, C.S., Maselli, V.M., Bowie, J.H., Tyler, M.J., Booker, G.W., Wallace, J.C., Carver, J.A., Separovic, F., Doyle, J., Llewellyn, L.E., 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>
- Arnheim, N., Erlich, H. 1992 *Polymerase Chain Reaction Strategy*. *Biochem.* 61; 131-56
- Arulanantham, R., Pathmanathan, S., Ravimannan, N., Niranjana, K., 2012. Alternative culture media for bacterial growth using different formulation of protein sources 4.
- Astrin, J.J., Huber, B.A., Misof, B., Klutsch, C.F.C., 2006. Molecular taxonomy in pholcid spiders (Pholcidae, Araneae): evaluation of species identification methods using CO1 and 16S rRNA. *Zool Scripta* 35, 441–457. <https://doi.org/10.1111/j.1463-6409.2006.00239.x>
- Ahumada A. 2005. Efectos de la salinidad sobre la supervivencia y crecimiento en larvas de *A. Andersoni* (Krebs AND Brandon, 1984) para fines de cultivo. Tesis de licenciatura. Facultad de Biología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
- Baker, G.C., Smith, J.J., Cowan, D.A., 2003. Review and re-analysis of

- domain-specific 16S primers. *Journal of Microbiological Methods* 55, 541–555. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.08.009>
- Banning, J.L., Weddle, A.L., Wahl III, G.W., Simon, M.A., Lauer, A., Walters, R.L., Harris, R.N., 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>
- Barrero Cuevas, L., 2016. *Microbiología clínica. Síntesis*, Madrid.
- Bataille, A., Lee-Cruz, L., Tripathi, B., Kim, H., Waldman, B., 2016. Microbiome Variation Across Amphibian Skin Regions: Implications for Chytridiomycosis Mitigation Efforts. *Microb Ecol* 71, 221–232. <https://doi.org/10.1007/s00248-015-0653-0>
- Bates, K.A., Shelton, J.M.G., Mercier, V.L., Hopkins, K.P., Harrison, X.A., Petrovan, S.O., 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., Richards-Zawacki, C.L., Gratwicke, B., Belden, 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., Hyatt, A., Speare, R., Longcore, J., 2005. Life cycle stages of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Dis. Aquat. Org.* 68, 51–63. <https://doi.org/10.3354/dao068051>
- Beveridge, T., J. 2001. Use of the Gram stain in microbiology. *Biotechnic y Histochemistry* 76: 111-118. <https://doi.org/10.1080/bih.76.3.111.118>
- Bird, A.K., Prado-Irwin, S.R., Vredenburg, V.T., Zink, A.G., 2018. Skin Microbiomes of California Terrestrial Salamanders Are Influenced by Habitat More Than Host Phylogeny. *Front. Microbiol.* 9, 442. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00442>
- Blair, K.M., Turner, L., Winkelman, J.T., Berg, H.C., Kearns, D.B., 2008. A Molecular Clutch Disables Flagella in the *Bacillus subtilis* Biofilm. *Science* 320, 1636–1638. <https://doi.org/10.1126/science.1157877>
- Bletz, M.C., Loudon, A.H., Becker, M.H., Bell, S.C., Woodhams, D.C., Minbiole, K.P.C., Harris, R.N., 2013. Mitigating amphibian chytridiomycosis with bioaugmentation: characteristics of effective probiotics and strategies for their selection and use. *Ecol Lett* 16, 807–820. <https://doi.org/10.1111/ele.12099>
- Bletz, Molly C., Archer, H., Harris, R.N., McKenzie, V.J., Rabemananjara, F.C.E., Rakotoarison, A., Vences, M., 2017a. Host Ecology Rather Than Host Phylogeny Drives Amphibian Skin Microbial Community Structure in the Biodiversity Hotspot of Madagascar. *Front. Microbiol.* 8, 1530. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01530>
- Bletz, M.C., Goedbloed, D.J., Sanchez, E., Reinhardt, T., Tebbe, C.C., Bhujju, S., Geffers, R., Jarek, M., Vences, M., Steinfartz, S., 2016. Amphibian gut microbiota shifts differentially in community structure but converges on habitat-specific predicted functions. *Nat Commun* 7, 13699. <https://doi.org/10.1038/ncomms13699>
- Bletz, Molly C, Perl, R.G.B., Bobowski, B.T., Japke, L.M., Tebbe, C.C., Dohrmann, A.B., Bhujju, S., Geffers, R., Jarek, M., Vences, M., 2017b. Amphibian skin microbiota exhibits temporal variation in community structure but stability of

- predicted *Bd*-inhibitory function. *ISME J* 11, 1521–1534.
<https://doi.org/10.1038/ismej.2017.41>
- Bletz, Molly C., Perl, R.G.B., Vences, M., 2017c. Skin microbiota differs drastically between co-occurring frogs and newts. *R. Soc. open sci.* 4, 170107.
<https://doi.org/10.1098/rsos.170107>
- Bletz, Molly C, Vences, M., Sabino-Pinto, J., Taguchi, Y., Shimizu, N., Nishikawa, K., Kurabayashi, A., 2017d. Cutaneous microbiota of the Japanese giant salamander (*Andrias japonicus*), a representative of an ancient amphibian clade. *Hydrobiologia* 795, 153–167. <https://doi.org/10.1007/s10750-017-3126-2>
- Bollinger, T.K., Mao, J., Schock, D., Brigham, R.M., Chinchar, V.G., 1999. Pathology, isolation, and preliminary molecular characterization of a novel iridovirus from tiger salamanders in saskatchewan. *Journal of Wildlife Diseases* 35, 413–429.
<https://doi.org/10.7589/0090-3558-35.3.413>
- Bischof, L., Převorovský, M., Rallis, C., Jeffares, D.C., Arzhaeva, Y., Bähler, J., 2016. Spotsizer: High-throughput quantitative analysis of microbial growth. *BioTechniques* 61. <https://doi.org/10.2144/000114459>
- Bosch, J., 2003. Nuevas amenazas para los anfibios: enfermedades emergentes. *MUNIBE* 16, 56-73
- Boyanova, L., 2018. Direct Gram staining and its various benefits in the diagnosis of bacterial infections. *Postgraduate Medicine* 130, 105–110.
<https://doi.org/10.1080/00325481.2018.1398049>
- Bresciano, J.C., Salvador, C.A., Paz-y-Miño, C., Parody-Merino, A.M., Bosch, J., 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>
- Briggler, J.T., Puckette, W.L., 2003. Observations on reproductive biology and brooding behavior of the ozark zigzag salamander,. *Southwestern Naturalist* 48, 8.
- Brito de Assis, A., dos Santos, C., Dutra, F.P., de Oliveira Motta, A., Costa, F.S., Navas, C.A., Magalhães, B.S., Barreto, C.C., 2016. Assessing Antibacterial Potential of Components of *Phyllomedusa distincta* Skin and its Associated Dermal Microbiota. *J Chem Ecol* 42, 139–148.
<https://doi.org/10.1007/s10886-016-0665-3>
- Brucker, R.M., Harris, R.N., Schwantes, C.R., Gallaher, T.N., Flaherty, D.C., Lam, B.A., Minbiole, K.P.C., 2008. Amphibian Chemical Defense: Antifungal Metabolites of the Microsymbiont *Janthinobacterium lividum* on the Salamander *Plethodon cinereus*. *J Chem Ecol* 34, 1422–1429.
<https://doi.org/10.1007/s10886-008-9555-7>
- Brunetti, A.E., Lyra, M.L., Melo, W.G.P., Andrade, L.E., Palacios-Rodríguez, P., Prado, B.M., Haddad, C.F.B., Pupo, M.T., Lopes, N.P., 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>
- Burkart, D., Flechas, S.V., Vredenburg, V.T., Catenazzi, A., 2017. Cutaneous bacteria, but not peptides, are associated with chytridiomycosis resistance in Peruvian marsupial frogs. *Anim Conserv* 20, 483–491. <https://doi.org/10.1111/acv.12352>
- Catenazzi, A., Flechas, S.V., Burkart, D., Hooven, N.D., Townsend, J., Vredenburg, V.T., 2018. Widespread Elevational Occurrence of Antifungal Bacteria in

- Andean Amphibians Decimated by Disease: A Complex Role for Skin Symbionts in Defense Against Chytridiomycosis. *Front. Microbiol.* 9, 465. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00465>
- Clarke, B.T., 2007. The natural history of amphibian skin secretions, their normal functioning and potential medical applications. *Biological Reviews* 72, 365–379. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1997.tb00018.x>
- Chen W, Zhang CK, Cheng Y, Zhang S, Zhao H (2013) A Comparison of Methods for Clustering 16S rRNA Sequences into OTUs. *PLoS ONE* 8(8): e70837. doi:10.1371/journal.pone.0070837
- Conlon, J.M., 2011. The contribution of skin antimicrobial peptides to the system of innate immunity in anurans. *Cell Tissue Res* 343, 201–212. <https://doi.org/10.1007/s00441-010-1014-4>
- Corrales-García, L.L., Ciro G. L. Péptidos con actividad antimicrobiana producidos por microorganismos nativos activos . *Vitae* 17, 181-190.
- Costantini, D., Melissah R., Michael W.B., McGraw. K.J. 2010. The ecology of antioxidants & oxidative stress in animals. From molecules to living systems: historical and contemporary issues in oxidative stress and antioxidant ecology. *Functional Ecology* 24, 950–959 doi: 10.1111/j.1365-2435.2010.01746.x
- Cramp, R.L., McPhee, R.K., Meyer, E.A., Ohmer, M.E., Franklin, C.E., 2014. First line of defence: the role of sloughing in the regulation of cutaneous microbes in frogs. *Conservation Physiology* 2, cou012–cou012. <https://doi.org/10.1093/conphys/cou012>
- Crandall, C., Abbott, S.L., Zhao, Y.Q., Probert, W., Janda, J.M., 2006. Isolation of Toxigenic *Hafnia alvei* from a Probable Case of Hemolytic Uremic Syndrome. *Infection* 34, 227–229. <https://doi.org/10.1007/s15010-006-5088-6>
- Dees, M.W., Brurberg, M.B., Lysøe, E., 2017. Complete genome sequence of the biofilm-forming *Microbacterium* sp. strain BH-3-3-3, isolated from conventional field-grown lettuce (*Lactuca sativa*) in Norway. *Genomics Data* 11, 7–8. <https://doi.org/10.1016/j.gdata.2016.11.018>
- Demircan, T., Ovezmyradov, G., Yıldırım, B., Keskin, İ., İlhan, A.E., Fesçioğlu, E.C., Öztürk, G., Yıldırım, S., 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., Borges, A., Saavedra, M.J., Simões, 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>
- Diario Oficial de la Federación (2010) *Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010*. Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo
- Drenkard, E., Ausubel, F.M., 2002. *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature* 416, 740–743. <https://doi.org/10.1038/416740a>
- Drancourt, M., Berger, P., Raoult, D., 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>
- Edwards, C.L., Byrne, P.G., Harlow, P., Silla, A.J., 2017. Dietary Carotenoid Supplementation Enhances the Cutaneous Bacterial Communities of the Critically Endangered Southern Corroboree Frog (*Pseudophryne corroboree*). *Microb Ecol* 73, 435–444. <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0853-2>
- Egea-Serrano, A., Relyea, R.A., Tejedo, M., Torralva, M., 2012. Understanding of the impact of chemicals on amphibians: a meta-analytic review: Impact of Pollution on Amphibians. *Ecology and Evolution* 2, 1382–1397. <https://doi.org/10.1002/ece3.249>
- Ellison, S., Rovito, S., Parra-Olea, G., Vásquez-Almazán, C., Flechas, S.V., Bi, K., Vredenburg, V.T., 2019. The Influence of Habitat and Phylogeny on the Skin Microbiome of Amphibians in Guatemala and Mexico. *Microb Ecol* 78, 257–267. <https://doi.org/10.1007/s00248-018-1288-8>
- Erlich, N.A.H., 1992. Polymerase chain reaction strategy. *Biochem* 61:131-156.
- Escalera-Vázquez, L.H., Hernández-Guzmán, R., Soto-Rojas, C., Suazo-Ortuño, I., 2018. Predicting *Ambystoma ordinarium* Habitat in Central Mexico Using Species Distribution Models. *Herpetologica* 74, 117–126. <https://doi.org/10.1655/Herpetologica-D-16-00078.1>
- Ezziyyani, M., Ahmed, A.S., Sanchez, P., Requena, M.E., Candela, M.E., 2006. Control biológico por microorganismos antagonistas *Revista de Horticultura*
- Fierer, N., Ferrenberg, S., Flores, G.E., González, A., Kueneman, J., Legg, T., Lynch, R.C., McDonald, D., Mihaljevic, J.R., O'Neill, S.P., Rhodes, M.E., Song, S.J., Walters, W.A., 2012. From Animalcules to an Ecosystem: Application of Ecological Concepts to the Human Microbiome. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 43, 137–155. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-110411-160307>
- Fink, R.C., Black, E.P., Hou, Z., Sugawara, M., Sadowsky, M.J., Diez-Gonzalez, F., 2012. Transcriptional Responses of *Escherichia coli* K-12 and O157:H7 Associated with Lettuce Leaves. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 1752–1764. <https://doi.org/10.1128/AEM.07454-11>
- Flechas, S.V., Acosta-González, A., Escobar, L.A., Kueneman, J.G., Sánchez-Quitian, Z.A., Parra-Giraldo, C.M., Rollins-Smith, L.A., Reinert, L.K., Vredenburg, V.T., Amézquita, A., Woodhams, D.C., 2019. Microbiota and skin defense peptides may facilitate coexistence of two sympatric Andean frog species with a lethal pathogen. *ISME J* 13, 361–373. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0284-9>
- Flechas, S.V., Blasco-Zúñiga, A., Merino-Viteri, A., Ramírez-Castañeda, V., Rivera, M., Amézquita, A., 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>
- Flechas, S.V., Sarmiento, C., Cárdenas, M.E., Medina, E.M., Restrepo, S., Amézquita, A., 2012. Surviving Chytridiomycosis: Differential Anti-Batrachochytrium dendrobatidis Activity in Bacterial Isolates from Three Lowland Species of *Atelopus*. *PLoS ONE* 7, e44832. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044832>
- Flemming, H.-C., Wingender, J., 2010. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* 8, 623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
- França, F.M., Dias, D. de C., Teixeira, P.C., Marcantônio, A.S., Stéfani, M.V.D., Antonucci, A., 2008. Efeito probiótico *Bacillus subtilis* no crescimento, sobrevivência e fisiologías de rãs-touro (*Rana catesbeiana*). *Pesca São Paulo*

- Fraser, G.M., Hughes, C., 1999. Swarming motility. *Current Opinion in Microbiology* 2, 630–635. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(99\)00033-8](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(99)00033-8)
- Freitas, J.J.G., Viau, P., Oliviera, C.A., Teixeira, P.C., Tachibana, L., de Carla Dias, D., Hipolito, M., Bordon, I.C.C., Alfaia, S.R., Ferreira, C.M., 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>
- Frese, S.A., MacKenzie, D.A., Peterson, D.A., Schmaltz, R., Fangman, T., Zhou, Y., Zhang, C., Benson, A.K., Cody, L.A., Mulholland, F., Juge, N., Walter, J., 2013. Molecular Characterization of Host-Specific Biofilm Formation in a Vertebrate Gut Symbiont. *PLoS Genet* 9, e1004057. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004057>
- Fuente-Núñez, C., Reffuveille, F., Fernández, L., Hancock, R.E., 2013. Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: antibiotic resistance and new therapeutic strategies. *Current Opinion in Microbiology* 16, 580–589. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.06.013>
- García-Mazcorro, J.F., Garza-González, E., Marroquín-Cardona, A.G., Tamayo, J.L., 2015. Caracterización, influencia y manipulación de la microbiota gastrointestinal en salud y enfermedad. *Gastroenterología y Hepatología* S0210570515000242. <https://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2015.01.004>
- Fuqua, C., Greenberg, E.P., 2002. Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 685–695. <https://doi.org/10.1038/nrm907>
- Gibbons, J.W., Scott, D.E., Ryan, T.J., Buhlmann, K.A., Tuberville, T.D., Metts, B.S., Greene, J.L., Mills, T., Leiden, Y., Poppy, S., Winne, C.T., 2000. The Global Decline of Reptiles, Déjà Vu Amphibians: Reptile species are declining on a global scale. Six significant threats to reptile populations are habitat loss and degradation, introduced invasive species, environmental pollution, disease, unsustainable use, and global climate change. *BioScience* 50, 653–666. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2000\)050\[0653:TGDORD\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2000)050[0653:TGDORD]2.0.CO;2)
- Gilbert, J.A., Dupont, C.L., 2011. Microbial Metagenomics: Beyond the Genome. *Annu. Rev. Mar. Sci.* 3, 347–371. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-120709-142811>
- Ghelardi, E., Celandroni, F., Salvetti, S., Ceragioli, M., Beecher, D.J., Senesi, S., Wong, A.C.L., 2007. Swarming Behavior of and Hemolysin BL Secretion by *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 4089–4093. <https://doi.org/10.1128/AEM.02345-06>
- Gray, M., Miller, D., Hoverman, J., 2009. Ecology and pathology of amphibian ranaviruses. *Dis. Aquat. Org.* 87, 243–266. <https://doi.org/10.3354/dao02138>
- Griffiths, R.A., Pavajeau, L., 2008. Captive Breeding, Reintroduction, and the Conservation of Amphibians: *Amphibian Captive Breeding*. *Conservation Biology* 22, 852–861. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2008.00967.x>
- Gusman, V., Medic, D., Jelesic, Z., Mihajlovic-Ukropina, M., 2012. *Sphingomonas paucimobilis* as a biofilm producer. *Arch biol sci (Beogr)* 64, 1327–1331. <https://doi.org/10.2298/ABS1204327G>
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W., Stoodley, P., 2004. Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* 2, 95–108.

- <https://doi.org/10.1038/nrmicro821>
- Han, X.Y., Pham, A.S., Tarrand, J.J., Sood, P.K., Luthra, R., 2002. Rapid and Accurate Identification of Mycobacteria by Sequencing Hypervariable Regions of the 16S Ribosomal RNA Gene. *Am J Clin Pathol* 118, 796–801. <https://doi.org/10.1309/HN44-XQYM-JMAQ-2EDL>
- Harris, R., Lauer, A., Simon, M., Banning, J., Alford, R., 2009a. Addition of antifungal skin bacteria to salamanders ameliorates the effects of chytridiomycosis. *Dis. Aquat. Org.* 83, 11–16. <https://doi.org/10.3354/dao02004>
- Harris, R.N., Brucker, R.M., Walke, J.B., Becker, M.H., Schwantes, C.R., Flaherty, D.C., Lam, B.A., Woodhams, D.C., Briggs, C.J., Vredenburg, V.T., Minbiole, K.P.C., 2009b. Skin microbes on frogs prevent morbidity and mortality caused by a lethal skin fungus. *ISME J* 3, 818–824. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.27>
- Harris, R.N., James, T.Y., Lauer, A., Simon, M.A., Patel, A., 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>
- Harrison, X.A., Price, S.J., Hopkins, K., Leung, W.T.M., Sergeant, C., Garner, T.W.J., 2019. Diversity-Stability Dynamics of the Amphibian Skin Microbiome and Susceptibility to a Lethal Viral Pathogen. *Front. Microbiol.* 10, 2883. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02883>
- Harshey, R.M., 2003. Bacterial Motility on a Surface: Many Ways to a Common Goal. *Annu. Rev. Microbiol.* 57, 249–273. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.091014>
- Heard, M.J., Smith, K.F., Ripp, K.J., Berger, M., Chen, J., Dittmeier, J., Goter, M., Mcgarvey, S.T., Ryan, E., 2013. The Threat of Disease Increases as Species Move Toward Extinction: Disease and Extinction. *Conservation Biology* 27, 1378–1388. <https://doi.org/10.1111/cobi.12143>
- Hernández-Gómez, O., Briggler, J.T., Williams, R.N., 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>
- Hobley, L., Harkins, C., MacPhee, C.E., Stanley-Wall, N.R., 2015. Giving structure to the biofilm matrix: an overview of individual strategies and emerging common themes. *FEMS Microbiology Reviews* 39, 649–669. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv015>
- Hughey, M.C., Walke, J.B., Becker, M.H., Umile, T.P., Burzynski, E.A., Minbiole, K.P.C., Iannetta, A.A., Santiago, C.N., Hopkins, W.A., Belden, L.K., 2016. Short-Term Exposure to Coal Combustion Waste Has Little Impact on the Skin Microbiome of Adult Spring Peepers (*Pseudacris crucifer*). *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 3493–3502. <https://doi.org/10.1128/AEM.00045-16>
- Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M.A., Hussain, T., Ali, M., Rafiq, M., Kamil, M.A., 2018. Bacterial biofilm and associated infections. *Journal of the Chinese Medical Association* 81, 7–11. <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2017.07.012>
- Jani, A.J., Briggs, C.J., 2014a. 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>
- Jani, A.J., Briggs, C.J., 2014b. 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>
- Jeckel, H., Jelli, E., Hartmann, R., Singh, P.K., Mok, R., Totz, J.F., Vidakovic, L., Eckhardt, B., Dunkel, J., Drescher, K., 2019. Learning the space-time phase diagram of bacterial swarm expansion. Proc Natl Acad Sci USA 116, 1489–1494. <https://doi.org/10.1073/pnas.1811722116>
- Karp G. 2006. Biología celular y molecular conceptos y experimentos. Cuarta edición McgGrawHill. México 834-835p.
- Kats, L.B., Ferrer, R.P., 2003. Alien BlackwellPublishing,Ltd predators and amphibian declines: review of two decades of science and the transition to conservation. Diversity and Distributions 12.
- Kearns, D.B., 2010. A field guide to bacterial swarming motility. Nat Rev Microbiol 8, 634–644. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2405>
- Kearns, D.B., Losick, R., 2003. Swarming motility in undomesticated *Bacillus subtilis*: *B. subtilis* swarming motility. Molecular Microbiology 49, 581–590.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03584.x>
- Kearns, D.B., 2010. A field guide to bacterial swarming motility. Nat Rev Microbiol 8, 634–644. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2405>
- Kearns, P.J., Fischer, S., Fernández-Beaskoetxea, S., Gabor, C.R., Bosch, J., Bowen, J.L., Tlustý, M.F., Woodhams, D.C., 2017. Fight Fungi with Fungi: Antifungal Properties of the Amphibian Mycobiome. Front. Microbiol. 8, 2494.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02494>
- Kembel, S.W., Wu, M., Eisen, J.A., Green, J.L., 2012. Incorporating 16S Gene Copy Number Information Improves Estimates of Microbial Diversity and Abundance. PLoS Comput Biol 8, e1002743. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002743>
- Knapp, R.A., Boiano, D.M., Vredenburg, V.T., 2007. Removal of nonnative fish results in population expansion of a declining amphibian (mountain yellow-legged frog, *Rana muscosa*). Biological Conservation 135, 11–20.
<https://doi.org/10.1016/j.biocon.2006.09.013>
- Knutie SA, Shea LA, Kupselaitis M, Wilkinson CL, Kohl KD, Rohr JR. Early-Life Diet Affects Host Microbiota and Later-Life Defenses Against Parasites in Frogs. Integr Comp Biol. 2017 Oct 1;57(4):732-742. doi: 10.1093/icb/icx028.
- Kueneman, J.G., Bletz, M.C., McKenzie, V.J., Becker, C.G., Joseph, M.B., Abarca, J.G., Archer, H., Arellano, A.L., Bataille, A., Becker, M., Belden, L.K., Crottini, A., Geffers, R., Haddad, Célio.F.B., Harris, R.N., Holden, W.M., Hughey, M., Jarek, M., Kearns, P.J., Kerby, J.L., Kielgast, J., Kurabayashi, A., Longo, A.V., Loudon, A., Medina, D., Nuñez, J.J., Perl, R.G.B., Pinto-Tomás, A., Rabemananjara, F.C.E., Rebollar, E.A., Rodríguez, A., Rollins-Smith, L., Stevenson, R., Tebbe, C.C., Vargas Asensio, G., Waldman, B., Walke, J.B., Whitfield, S.M., Zamudio, K.R., Zúñiga Chaves, I., Woodhams, D.C., Vences, M., 2019. Community richness of amphibian skin bacteria correlates with bioclimate at the global scale. Nat Ecol Evol 3, 381–389.

- <https://doi.org/10.1038/s41559-019-0798-1>
- Kueneman, J.G., Parfrey, L.W., Woodhams, D.C., Archer, H.M., Knight, R., McKenzie, V.J., 2014. The amphibian skin-associated microbiome across species, space and life history stages. *Mol Ecol* 23, 1238–1250.
<https://doi.org/10.1111/mec.12510>
- Kueneman, J.G., Woodhams, D.C., Harris, R., Archer, H.M., Knight, R., McKenzie, V.J., 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>
- Kumar, L., Chhibber, S., Harjai, K., 2013. Zingerone inhibit biofilm formation and improve antibiofilm efficacy of ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Fitoterapia* 90, 73–78. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2013.06.017>
- Lai, S., Tremblay, J., Déziel, E., 2009. Swarming motility: a multicellular behaviour conferring antimicrobial resistance. *Environmental Microbiology* 11, 126–136.
<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01747.x>
- Lam, B.A., Walke, J.B., Vredenburg, V.T., Harris, R.N., 2010. Proportion of individuals with anti-Batrachochytrium dendrobatidis skin bacteria is associated with population persistence in the frog *Rana muscosa*. *Biological Conservation* 143, 529–531. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2009.11.015>
- Lam, B.A., Walton, D.B., Harris, R.N., 2011. Motile Zoospores of *Batrachochytrium dendrobatidis* Move Away from Antifungal Metabolites Produced by Amphibian Skin Bacteria. *EcoHealth* 8, 36–45. <https://doi.org/10.1007/s10393-011-0689-7>
- Lapidot, A., Romling, U., Yaron, S., 2006. Biofilm formation and the survival of *Salmonella Typhimurium* on parsley. *International Journal of Food Microbiology* 109, 229–233. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.01.012>
- Lara J. S. M., 2015. Aproximación metagenómica para la identificación de enzimas lipolíticas en suelo de bosque alto andino del parque nacional natural los nevados. Tesis de doctorado en Ciencias Biológicas. Pontificia Universidad Javeriana Facultad De Ciencias Posgrado En Ciencias Biológicas. Bogotá. Colombia 127pp.
- Lauer, A., Simon, M.A., Banning, J.L., André, E., Duncan, K., Harris, R.N., 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., Simon, M.A., Banning, J.L., Lam, B.A., Harris, R.N., 2008. Diversity of cutaneous bacteria with antifungal activity isolated from female four-toed salamanders. *ISME J* 2, 145–157. <https://doi.org/10.1038/ismej.2007.110>
- Longo, A.V., Zamudio, K.R., 2017. Temperature variation, bacterial diversity and fungal infection dynamics in the amphibian skin. *Mol Ecol* 26, 4787–4797.
<https://doi.org/10.1111/mec.14220>
- Longo, F., Vuotto, C., Donelli, G., 2014. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*. *New Microbiologica*, 37, 119-127. <https://doi.org/10.3390/molecules24101849>
- López-Jácome, L.E., Hernández-Durán, M., Colín-Castro, C.A., Ortega-Peña, S., Cerón-González, G., Franco-Cendejas, R., 2014. Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Investigación en Discapacidad*. 3.10-18
- Loudon, A.H., Holland, J.A., Umile, T.P., Burzynski, E.A., Minbiole, K.P.C., Harris, R.N., 2014b. Interactions between amphibians' symbiotic bacteria cause the production of emergent anti-fungal metabolites. *Front. Microbiol.* 5.

- <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00441>
- Loudon, A.H., Woodhams, D.C., Parfrey, L.W., Archer, H., Knight, R., McKenzie, V., Harris, R.N., 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>
- Macfarlane, S., Hopkins, M.J., Macfarlane, G.T., 2001. Toxin Synthesis and Mucin Breakdown Are Related to Swarming Phenomenon in *Clostridium septicum*. *Infect. Immun.* 69, 1120–1126. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.2.1120-1126.2001>
- Madigan M.T, Martinko J.M., Parker J. Brock, 2004. *Biología de los microorganismos*, 10a edición, UK, Pearson Education,.
- Macedo, A.C., n.d. Rizobacterias Aisladas del Trópico Húmedo con Actividad Antagónica sobre *Colletotrichum gloeosporioides*, Evaluación Cuantitativa e Identificación Molecular 20.
- Madison, J.D., Berg, E.A., Abarca, J.G., Whitfield, S.M., Gorbatenko, O., Pinto, A., Kerby, J.L., 2017. Characterization of *Batrachochytrium dendrobatidis* Inhibiting Bacteria from Amphibian Populations in Costa Rica. *Front. Microbiol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00290>
- March, J.C., Bentley, W.E., 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., Spitzen-van der Sluijs, A., Blooi, M., Bert, W., Ducatelle, R., Fisher, M.C., Woeltjes, A., Bosman, W., Chiers, K., Bossuyt, F., Pasmans, F., 2013. *Batrachochytrium salamandrivorans* sp. nov. causes lethal chytridiomycosis in amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 15325–15329. <https://doi.org/10.1073/pnas.1307356110>
- McKenzie, V.J., Bowers, R.M., Fierer, N., Knight, R., Lauber, C.L., 2012. Co-habiting amphibian species harbor unique skin bacterial communities in wild populations. *ISME J* 6, 588–596. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.129>
- Magrex-Debar, E., Lemoine, J., Gellé, M.-P., Jacquelin, L.-F., Choisy, C., 2000. Evaluation of biohazards in dehydrated biofilms on foodstuff packaging. *International Journal of Food Microbiology* 55, 239–243. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00177-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00177-X)
- Meyer, E., Cramp, R., Bernal, M., Franklin, C., 2012. Changes in cutaneous microbial abundance with sloughing: possible implications for infection and disease in amphibians. *Dis. Aquat. Org.* 101, 235–242. <https://doi.org/10.3354/dao02523>
- Michaels CJ, Antwis RE, Preziosi RF (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., Flandrois, J.P., 2006. 16S rRNA sequencing in routine bacterial identification: A 30-month experiment. *Journal of Microbiological Methods* 67, 574–581. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.05.009>
- Miller, D., Gray, M., Storfer, A., 2011. Ecopathology of Ranaviruses Infecting Amphibians. *Viruses* 3, 2351–2373. <https://doi.org/10.3390/v3112351>
- Montes-Calderón, M.A., Alvarado-Díaz, J., 2011. Abundancia, actividad espacial y crecimiento de *Ambystoma ordinarium* Taylor 1940 (Caudata: Ambystomatidae) en Michoacán, México 13, 4.
- Morris, C.E., Monier, J.-M., 2003. The ecologica significant of biofilm formation by

- plant-associated bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 41, 429–453.
<https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.41.022103.134521>
- Muletz, C.R., Myers, J.M., Domangue, R.J., Herrick, J.B., Harris, R.N., 2012. Soil bioaugmentation with amphibian cutaneous bacteria protects amphibian hosts from infection by *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Biological Conservation* 152, 119–126. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2012.03.022>
- Muletz Wolz, C.R., Yarwood, S.A., Campbell Grant, E.H., Fleischer, R.C., Lips, K.R., 2017. Effects of host species and environment on the skin microbiome of Plethodontid salamanders. *J Anim Ecol* 87, 341–353.
<https://doi.org/10.1111/1365-2656.12726>
- Myers, J.M., Ramsey, J.P., Blackman, A.L., Nichols, A.E., Minbiole, K.P.C., Harris, R.N., 2012. Synergistic Inhibition of the Lethal Fungal Pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*: The Combined Effect of Symbiotic Bacterial Metabolites and Antimicrobial Peptides of the Frog *Rana muscosa*. *J Chem Ecol* 38, 958–965. <https://doi.org/10.1007/s10886-012-0170-2>
- Negrete, R. P., J. M. Romero., 1999. Aislamiento de bacterias asociadas con infecciones en el cultivo de ajolote; *Ambystoma mexicanus*. *Hidrobiológicas* 9, 9-14.
- N., Warnow, T., Pop, M. White B. (2016) A perspective on 16S rRNA operational taxonomic unit clustering using sequence similarity. *npj Biofilms Microbiomes* 2, 16004. <https://doi.org/10.1038/npjbiofilms.2016.4>
- Nichols, D.K., Lamirande, E.W., Pessier, A.P., Longcore, J.E., 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>
- Nichols, R.J., Sen, S., Choo, Y.J., Beltrao, P., Zietek, M., Chaba, R., Lee, S., Kazmierczak, K.M., Lee, K.J., Wong, A., Shales, M., Lovett, S., Winkler, M.E., Krogan, N.J., Typas, A., Gross, C.A., 2011. Phenotypic Landscape of a Bacterial Cell. *Cell* 144, 143–156. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.11.052>
- Niederle, M.V., Bosch, J., Ale, C.E., Nader-Macías, M.E., Aristimuño Ficooseco, C., Toledo, L.F., Valenzuela-Sánchez, A., Soto-Azat, C., Pasteris, S.E., 2019. Skin-associated lactic acid bacteria from North American bullfrogs as potential control agents of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *PLoS ONE* 14, e0223020. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223020>
- Ohmer, M.E.B., Cramp, R.L., Russo, C.J.M., White, C.R., Franklin, C.E., 2017. Skin sloughing in susceptible and resistant amphibians regulates infection with a fungal pathogen. *Sci Rep* 7, 3529. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03605-z>
- O'Toole G.A. (2011). Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. *JoVE*. 47. DOI: 10.3791/2437
- O'Toole, G., Kaplan, H.B., Kolter, R., 2000. Biofilm Formation as Microbial Development. *Annu. Rev. Microbiol.* 54, 49–79.
<https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.49>
- Parra-Olea, G., Flores-Villela, O., Mendoza-Almeralla C., 2014. Biodiversidad de anfibios en México. *Rev. Mex. Biodiv*, 85, 60-66.
<http://dx.doi.org/10.7550/rmb.32027>.
- Parra-Olea, G., Zamudio, K.R., Recuero, E., Aguilar-Miguel, X., Huacuz, D., Zambrano, L., 2012. Conservation genetics of threatened Mexican axolotls (*Ambystoma*): Conservation of Mexican axolotls. *Anim Conserv* 15, 61–72. <https://doi.org/10.1111/j.1469-1795.2011.00488.x>

- Passos, L.F., Garcia, G., Young, R.J., 2018. Comparing the bacterial communities of wild and captive golden mantella frogs: Implications for amphibian conservation. *PLoS ONE* 13, e0205652. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205652>
- Pereira, C.N., Di Rosa, I., Fagotti, A., Simoncelli, F., Pascolini, R., Mendoza, L., 2005. The Pathogen of Frogs *Amphibiocystidium 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>
- Pimm, S.L., Jenkins, C.N., Abell, R., Brooks, T.M., Gittleman, J.L., Joppa, L.N., Raven, P.H., Roberts, C.M., Sexton, J.O., 2014. The biodiversity of species and their rates of extinction, distribution, and protection. *Science* 344, 1246752–1246752. <https://doi.org/10.1126/science.1246752>
- Piovia-Scott, J., Rejmanek, D., Woodhams, D.C., Worth, S.J., Kenny, H., McKenzie, V., Lawler, S.P., Foley, J.E., 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>
- Podschun, R., Fischer, A., Ullmann, U., 2001. Characterisation of *Hafnia alvei* isolates from human clinical extra-intestinal specimens: haemagglutinins, serum resistance and siderophore synthesis. *Journal of Medical Microbiology* 50, 208–214. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-50-3-208>
- Prado-Irwin, S.R., Bird, A.K., Zink, A.G., Vredenburg, V.T., 2017. Intraspecific Variation in the Skin-Associated Microbiome of a Terrestrial Salamander. *Microb Ecol* 74, 745–756. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-0986-y>
- Prest, T.L., Kimball, A.K., Kueneman, J.G., McKenzie, V.J., 2018. Host-associated bacterial community succession during amphibian development. *Mol Ecol* 27, 1992–2006. <https://doi.org/10.1111/mec.14507>
- Rasmussen-Ivey, C.R., Figueras, M.J., McGarey, D., Liles, M.R., 2016. Virulence Factors of *Aeromonas hydrophila*: In the Wake of Reclassification. *Front. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01337>
- Real, F., Fernandez, A., Acosta, F., Acosta, B., Castro, P., Deniz, S., Oros, J., 1997. Septicemia Associated with *Hafnia alvei* in Laying Hens. *Avian Diseases* 41, 741. <https://doi.org/10.2307/1592170>
- Rebollar, E.A., Gutiérrez-Preciado, A., Noecker, C., Eng, A., Hughey, M.C., Medina, D., Walke, J.B., Borenstein, E., Jensen, R.V., Belden, L.K., Harris, R.N., 2018. The Skin Microbiome of the Neotropical Frog *Craugastor fitzingeri*: Inferring Potential Bacterial-Host-Pathogen Interactions From Metagenomic Data. *Front. Microbiol.* 9, 466. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00466>
- Rebollar, E. A., Martínez-Ugalde, E., y Orta, A. (2020). The Amphibian Skin Microbiome and Its Protective Role Against Chytridiomycosis. *Herpetologica*. 76. 167. [10.1655/0018-0831-76.2.167](https://doi.org/10.1655/0018-0831-76.2.167).
- Ringo, E., Lovmo, L., Kristiansen, M., Bakken, Y., Salinas, I., Myklebust, R., Olsen, R.E., Mayhew, T.M., 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>
- Rollins-Smith, L.A., Ramsey, J.P., Pask, J.D., Reinert, L.K., Woodhams, D.C., 2011. Amphibian Immune Defenses against Chytridiomycosis: Impacts of Changing Environments. *Integrative and Comparative Biology* 51, 552–562.

- <https://doi.org/10.1093/icb/icr095>
- Roth, T., Foley, J., Worth, J., Piovio-Scott, J., Pope, K., Lawler, S., 2013. Bacterial flora on Cascades frogs in the Klamath mountains of California. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 36, 591–598.
<https://doi.org/10.1016/j.cimid.2013.07.002>
- Sabino-Pinto, J., Bletz, M.C., Islam, M.M., Shimizu, N., Bhujju, S., Geffers, R., Jarek, M., Kurabayashi, A., Vences, M., 2016. Composition of the Cutaneous Bacterial Community in Japanese Amphibians: Effects of Captivity, Host Species, and Body Region. *Microb Ecol* 72, 460–469.
<https://doi.org/10.1007/s00248-016-0797-6>
- Sanchez, E., Bletz, M.C., Duntsch, L., Bhujju, S., Geffers, R., Jarek, M., Dohrmann, A.B., Tebbe, C.C., Steinfartz, S., Vences, M., 2017. Cutaneous Bacterial Communities of a Poisonous Salamander: a Perspective from Life Stages, Body Parts and Environmental Conditions. *Microb Ecol* 73, 455–465.
<https://doi.org/10.1007/s00248-016-0863-0>
- Sanchez Ortiz, A.C., Luna Gonzalez, A., Campa Cordova, A.I., Escamilla Montes, R., Flores Miranda, M. del C., Mazon Suastegui, J.M., 2015a. Isolation and characterization of potential probiotic bacteria from pustulose ark (*Anadara tuberculosa*) suitable for shrimp farming. *IJAR* 43, 123–136.
<https://doi.org/10.3856/vol43-issue1-fulltext-11>
- Schadich, E., 2009. Skin Peptide Activities against Opportunistic Bacterial Pathogens of the African Clawed Frog (*Xenopus laevis*) and Three Litoria Frogs. *Journal of Herpetology* 43, 173–183. <https://doi.org/10.1670/08-113R1.1>
- Senesi, S., Celandroni, F., Salvetti, S., Beecher, D.J., Wong, A.C.L., Ghelardi, E., n.d. Swarming motility in *Bacillus cereus* and characterization of a *fliY* mutant impaired in swarm cell differentiation. *Microbiology* 148, 1785–1794.
<https://doi.org/10.1099/00221287-148-6-1785>
- Senesi, S., Ghelardi, E., Celandroni, F., Salvetti, S., Parisio, E., Galizzi, A., 2004. Surface-Associated Flagellum Formation and Swarming Differentiation in *Bacillus subtilis* Are Controlled by the *ifm* Locus. *JB* 186, 1158–1164.
<https://doi.org/10.1128/JB.186.4.1158-1164.2004>
- Shaffer HB (1989) Natural history, ecology and evolution of the Mexican “Axolotls”. *Axolotl Newsletter* (18): 5-11
- 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>
- Shaw, S.D., Berger, L., Bell, S., Dodd, S., James, T.Y., Skerratt, L.F., Bishop, P.J., Speare, R., 2014. Baseline cutaneous bacteria of free-living new zealand native frogs (*Leiopelma archeyi* and *Leiopelma hochstetteri*) and implications for their role in defense against the amphibian chytrid (*batrachochytrium dendrobatidis*). *Journal of Wildlife Diseases* 50, 723–732.
<https://doi.org/10.7589/2013-07-186>
- Shrout, J.D., Chopp, D.L., Just, C.L., Hentzer, M., Givskov, M., Parsek, M.R., 2006. The impact of quorum sensing and swarming motility on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation is nutritionally conditional. *Mol Microbiol* 62, 1264–1277. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05421.x>
- Skerratt, L.F., Berger, L., Speare, R., Cashins, S., McDonald, K.R., Phillott, A.D.,

- Hines, H.B., Kenyon, N., 2007. Spread of Chytridiomycosis Has Caused the Rapid Global Decline and Extinction of Frogs. *EcoHealth* 4, 125. <https://doi.org/10.1007/s10393-007-0093-5>
- Smith, H.K., Pasmans, F., Dhaenens, M., Deforce, D., Bonte, D., Verheyen, K., Lens, L., Martel, A., 2018. Skin mucosome activity as an indicator of *Batrachochytrium* salamandrivorans susceptibility in salamanders. *PLoS ONE* 13, e0199295. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199295>
- Soto, G.E., Hultgren, S.J., 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>
- Soto-Rojas, C. 2012. Uso y selección del microhábitat de la salamandra de montaña *Ambystoma ordinarium*. Tesis UMSNH, México
- Soto-Rojas, C., Suazo-Ortuño, I., Montoya Laos, J.A., Alvarado-Díaz, J., 2017. Habitat quality affects the incidence of morphological abnormalities in the endangered salamander *Ambystoma ordinarium*. *PLoS ONE* 12, e0183573. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183573>
- Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., Bonaventura, G.D., Djukić, S., Ćirković, I., Ruzicka, F., 2007. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Apmis* 115, 891–899. https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G., Costerton, J.W., 2002. Biofilms as Complex Differentiated Communities. *Annu. Rev. Microbiol.* 56, 187–209. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160705>
- Stuart, S.N., Chanson, J.S., Cox, N.A., Young, B.E., Rodrigues, A.S.L., Fischman, D.L., Waller, R.W., 2004. Status and Trends of Amphibian Declines and Extinctions Worldwide. *Science* 306, 1783–1786. <https://doi.org/10.1126/science.1103538>
- Tang, L., Schramm, A., Neu, T.R., Revsbech, N.P., Meyer, R.L., 2013. Extracellular DNA in adhesion and biofilm formation of four environmental isolates: a quantitative study. *FEMS Microbiol Ecol* 86, 394–403. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12168>
- Thairu, Y., Usman, Y., Nasir, I., 2014. Laboratory perspective of gram staining and its significance in investigations of infectious diseases. *Sub-Saharan Afr J Med* 1, 168. <https://doi.org/10.4103/2384-5147.144725>
- Taylor, E. H. 1940. *Ambystoma ordinarium*. *Herpetologica* 1: 171
- Ujszegi, J., Móricz, Á.M., Krüzselyi, D., Hettyey, A., 2017. Skin toxin production of toads changes during early ontogeny but is not adjusted to the microbiota of the aquatic environment. *Evol Ecol* 31, 925–936. <https://doi.org/10.1007/s10682-017-9920-5>
- Varela, B.J., Lesbarrères, D., Ibáñez, R., Green, D.M., 2018. Environmental and Host Effects on Skin Bacterial Community Composition in Panamanian Frogs. *Front. Microbiol.* 9, 298. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00298>
- Varga, J.F.A., Bui-Marinós, M.P., Katzenback, B.A., 2019. Frog Skin Innate Immune Defences: Sensing and Surviving Pathogens. *Front. Immunol.* 9, 3128. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03128>
- Vestby, L. K., Grønseth, T., Simm, R., & Nesse, L. L. (2020). Bacterial Biofilm and its

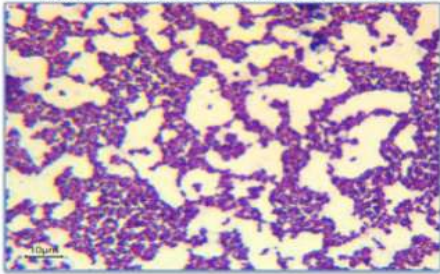
- Role in the Pathogenesis of Disease. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 9(2), 59. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9020059>
- Verstraeten, N., Braeken, K., Debkumari, B., Fauvart, M., Fransaer, J., Vermant, J., Michiels, J., 2008. Living on a surface: swarming and biofilm formation. *Trends in Microbiology* 16, 496–506. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.07.004>
- Vivas, J., Padilla, D., Real, F., Bravo, J., Grasso, V., Acosta, F., 2008. Influence of environmental conditions on biofilm formation by *Hafnia alvei* strains. *Veterinary Microbiology* 129, 150–155. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.11.007>
- Vredenburg, V.T., Briggs, C.J Harris R. 2011. Host-pathogen dynamics of amphibian chytridiomycosis: the role of the skin microbiome in health and disease. The National Academies Press. <https://www.researchgate.net/publication/285633327>
- Wang, Q., Frye, J.G., McClelland, M., Harshey, R.M., 2004. Gene expression patterns during swarming in *Salmonella typhimurium*: genes specific to surface growth and putative new motility and pathogenicity genes: Patterns of gene expression during swarming in *S. typhimurium*. *Molecular Microbiology* 52, 169–187. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2003.03977.x>
- Wake, D.B., Vredenburg, V.T., 2008. Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 11466–11473. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801921105>
- Walke, J.B., Becker, M.H., Hughey, M.C., Swartwout, M.C., Jensen, R.V., Belden, L.K., 2015a. Most of the Dominant Members of Amphibian Skin Bacterial Communities Can Be Readily Cultured. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 6589–6600. <https://doi.org/10.1128/AEM.01486-15>
- Walke, J.B., Becker, M.H., Loftus, S.C., House, L.L., Teotonio, T.L., Minbiole, K.P.C., Belden, L.K., 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>
- Walke, J.B., Harris, R.N., Reinert, L.K., Rollins-Smith, L.A., Woodhams, D.C., 2011. Social Immunity in Amphibians: Evidence for Vertical Transmission of Innate Defenses: Vertical Transmission of Amphibian Immunity. *Biotropica* 43, 396–400. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7429.2011.00787.x>
- Wanger, T.C., Iskandar, D.T., Motzke, I., Brook, B.W., Sodhi, N.S., Clough, Y., Tschardtke, T., 2010. Effects of Land-Use Change on Community Composition of Tropical Amphibians and Reptiles in Sulawesi, Indonesia: Effects of Land-Use Change on Herpetofauna. *Conservation Biology* 24, 795–802. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2009.01434.x>
- Weisrock D.W, Shaffer H.B, Storz B.L, Storz S.R, Voss S.R., 2006. Multiple nuclear gene sequences identify phylogenetic species boundaries in the rapidly radiating clade of Mexican ambystomatid salamanders. *Molecular Ecology* 15, 2489-2503. doi:10.1111/j.1365-294X.2006.02961.x
- Wei, Q., Ma, L., 2013. Biofilm Matrix and Its Regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *IJMS* 14, 20983–21005. <https://doi.org/10.3390/ijms141020983>
- Welin-Neilands, J., Svensäter, G., 2007. Acid Tolerance of Biofilm Cells of *Streptococcus mutans*. *AEM* 73, 5633–5638. <https://doi.org/10.1128/AEM.01049-07>
- Whitehead, N.A., Barnard, A.M.L., Slater, H., Simpson, N.J.L., Salmond, G.P.C., 2001.

- Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 25, 365–404. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2001.tb00583.x>
- Woodhams, D.C., Alford, R.A., Antwis, R.E., Archer, H., Becker, M.H., Belden, L.K., Bell, S.C., Bletz, M., Daskin, J.H., Davis, L.R., Flechas, S.V., Lauer, A., Gonzalez, A., Harris, R.N., Holden, W.M., Hughey, M.C., Ibáñez, R., Knight, R., Kueneman, J., Rabemananjara, F., Reinert, L.K., Rollins-Smith, L.A., Roman-Rodriguez, F., Shaw, S.D., Walke, J.B., McKenzie, V., 2015. Antifungal isolates database 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>
- Woodhams, D. C., Ardipradja, K., Alford, R.A., Marantelli, G., Reinert, L.K., Rollins-Smith, L.A., 2007a. 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., Bletz, M., Kueneman, J., McKenzie, V., 2016. Managing Amphibian Disease with Skin Microbiota. *Trends in Microbiology* 24, 161–164. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.12.010>
- Woodhams, D.C., Brandt, H., Baumgartner, S., Kielgast, J., Küpfer, E., Tobler, U., Davis, L.R., Schmidt, B.R., Bel, C., Hodel, S., Knight, R., McKenzie, V., 2014. Interacting Symbionts and Immunity in the Amphibian Skin Mucosome Predict Disease Risk and Probiotic Effectiveness. *PLoS ONE* 9, e96375. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096375>
- Woodhams, D.C., LaBumard, B.C., Barnhart, K.L., Becker, M.H., Bletz, M.C., Escobar, L.A., Flechas, S.V., Forman, M.E., Iannetta, A.A., Joyce, M.D., Rabemananjara, F., Gratwicke, B., Vences, M., Minbiole, K.P.C., 2018. Prodigiosin, Violacein, and Volatile Organic Compounds Produced by Widespread Cutaneous Bacteria of Amphibians Can Inhibit Two *Batrachochytrium* Fungal Pathogens. *Microb Ecol* 75, 1049–1062. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-1095-7>
- Woodhams, D.C., Rollins-Smith, L.A., Reinert, L.K., Lam, B.A., Harris, R.N., Briggs, C.J., Vredenburg, V.T., Patel, B.T., Caprioli, R.M., Chaurand, P., Hunziker, P., Bigler, L., 2020. Probiotics Modulate a Novel Amphibian Skin Defense Peptide That Is Antifungal and Facilitates Growth of Antifungal Bacteria. *Microb Ecol* 79, 192–202. <https://doi.org/10.1007/s00248-019-01385-9>
- Woodhams, D. C., Vredenburg, V.T., Simon, M.-A., Billheimer, D., Shakhtour, B., Shyr, Y., Briggs, C.J., Rollins-Smith, L.A., Harris, R.N., 2007b. Symbiotic bacteria contribute to innate immune defenses of the threatened mountain yellow-legged frog, *Rana muscosa*. *Biological Conservation* 138, 390–398. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2007.05.004>
- Yaron, S., Römling, U., 2014. Biofilm formation by enteric pathogens and its role in plant colonization and persistence: Biofilms of human pathogens on plants. *Microbial Biotechnology* 7, 496–516. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12186>
- Zheng, R., Wu, S., Ma, N., Sun, C., 2018. Genetic and Physiological Adaptations of Marine Bacterium *Pseudomonas stutzeri* 273 to Mercury Stress. *Front. Microbiol.* 9, 682. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00682>

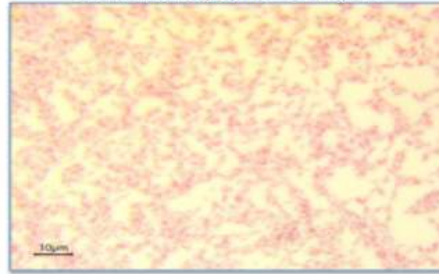
X. ANEXO

Fotografías de tinción Gram de las bacterias cultivadas en la piel de *A. ordinarium*

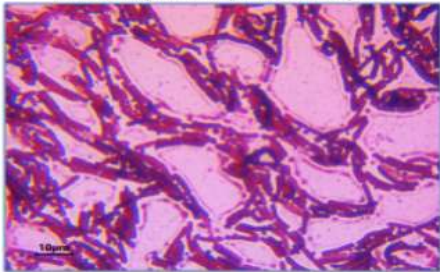
Staphylococcus epidermis (MN889374.1) 132



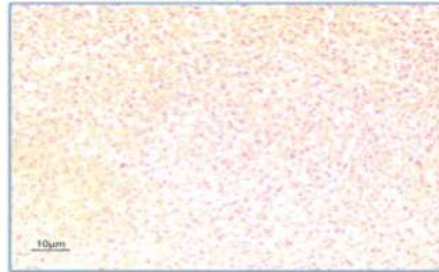
Pseudomonas sp. (AB548850.1)135



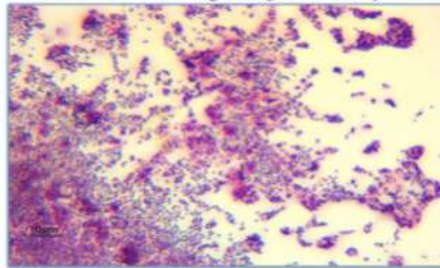
Bacillus aryabhattai (MH261178.1) 211



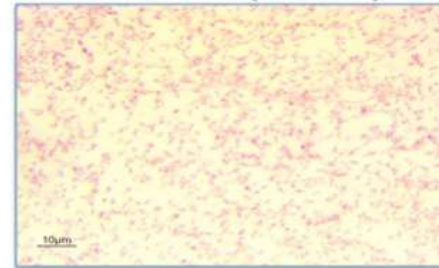
Microbacterium sp. (MN900709.1) 314



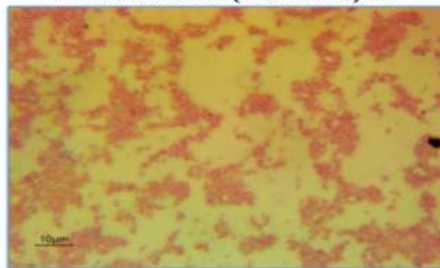
Pseudomonas alcaligenes (JX501351.1) 316



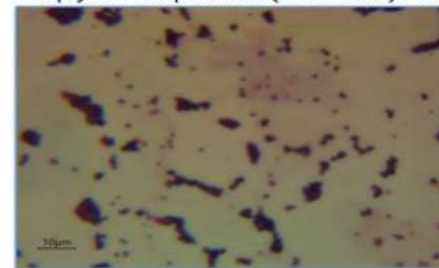
Pseudomonas stutzeri (MN889370.1) 326



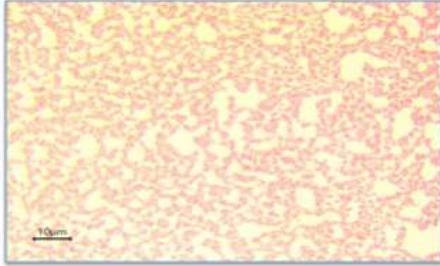
Pseudomas stutzeri (Mn889370.1) 327



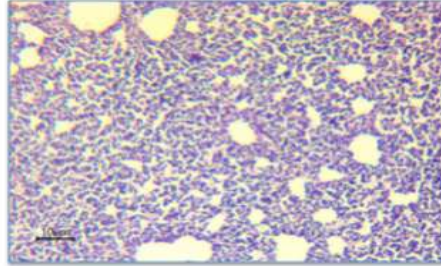
Staphylococcus epidermidis (KX454061.1) 3310



Hafnia alvei (DQ412565.1) 421



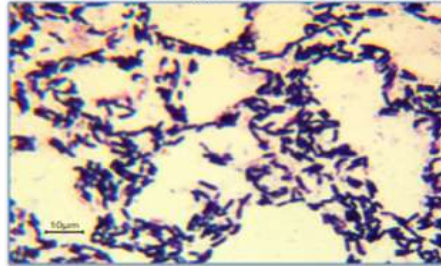
Henterobacter homaechei (LC515572.1) 422



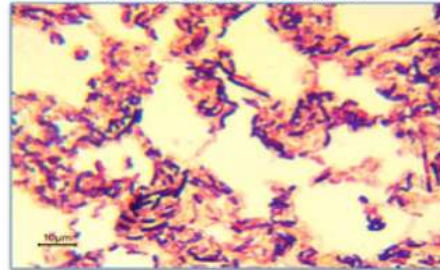
Bacillus sp. (MK613086.1) 423



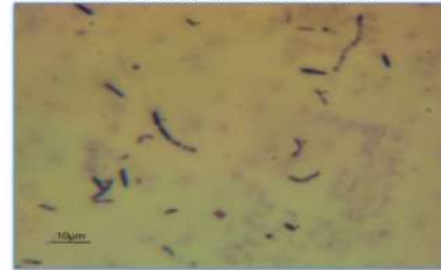
Bacillaceae(JX0648890.1) 511



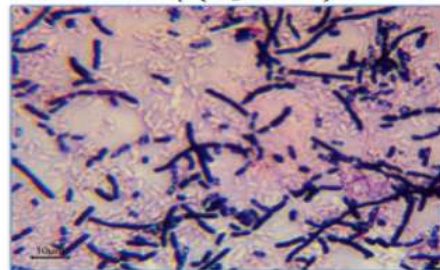
Bacillus sp. (FJ463650.1) 512



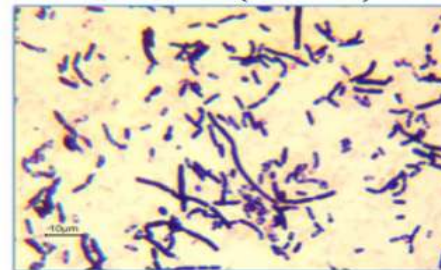
Lysinibacillus sp. (NZ_CP006837.1) 513



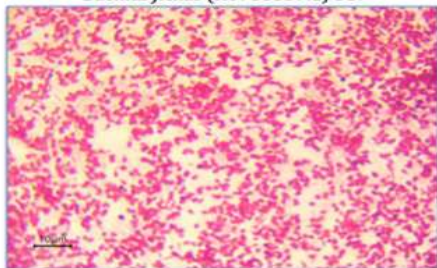
Bacillus sp. (NC_022781.1) 514



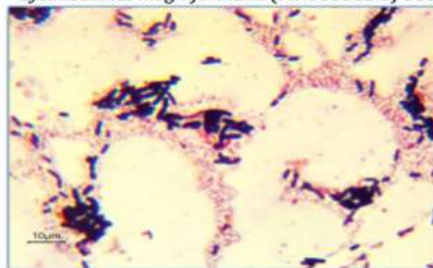
Bacillus wiedmannii (MN803228.1) 515



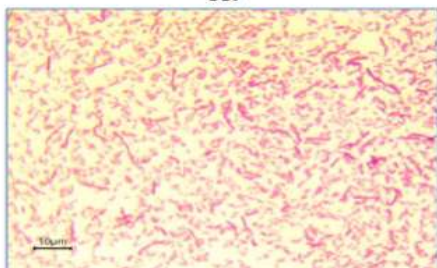
Bacillus flexus (KT758537.1) 517



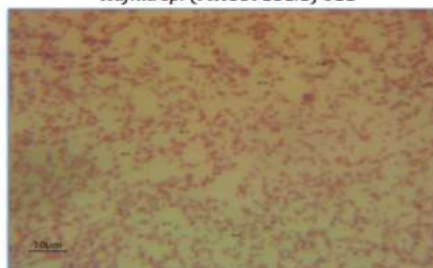
Lysinibacillus magniferihumi (MN335312.1) 518



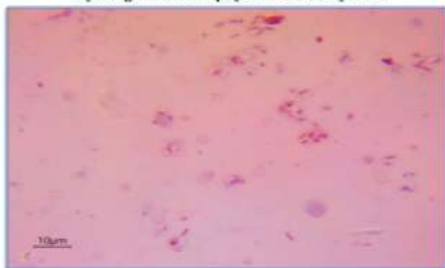
519



Hafnia sp. (MH669181.1) 611



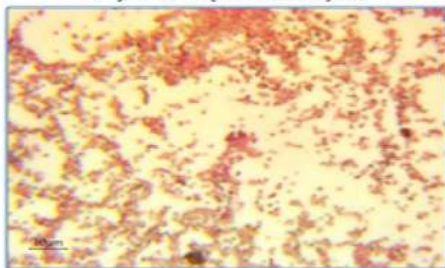
Sphingomonas sp.(MN811062) 612



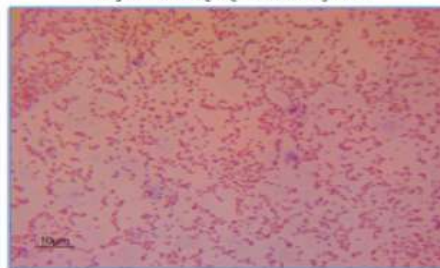
Hafnia sp. (NZ_CP014031.2) 623



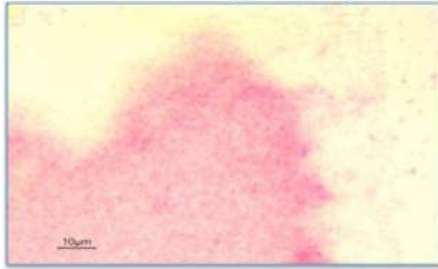
Hafnia alvei (KX674363.1)624



Hafnia alvei (DQ412565.1) 625



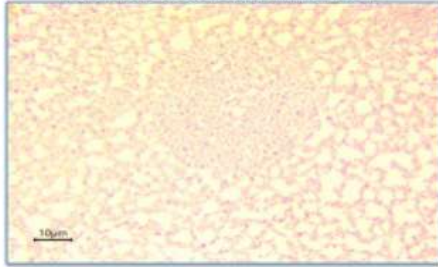
Enterobacteriaceae (JX162076.1) 636



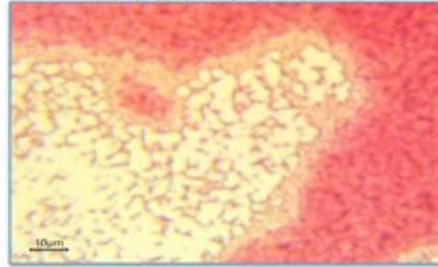
Hafnia sp. (MH66918.1) 638



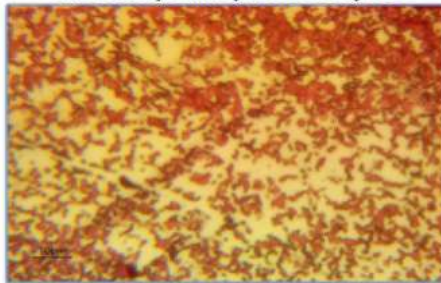
Enterobacteriaceae (JX162076.1) 639



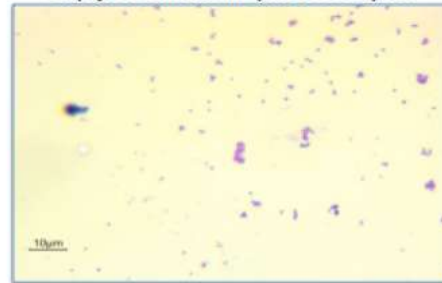
Hafnia sp. (MH669181.1) 6310



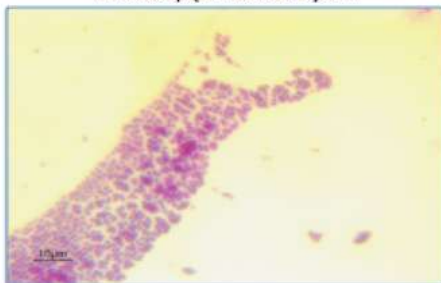
Citrobacter freundii (MH668092.1) 712



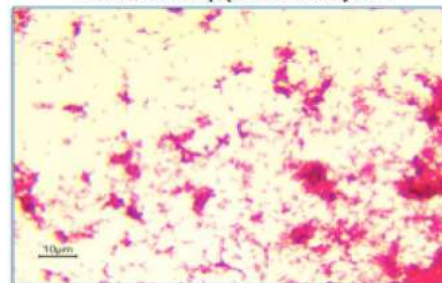
Staphylococcus vitinius (KX246684.1) 725



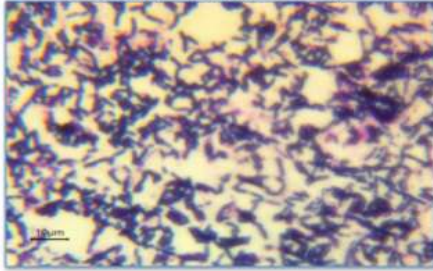
Bacillus sp.(MT197315.1) 811



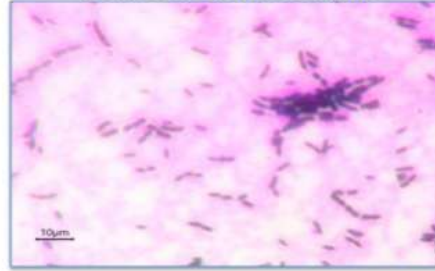
Pseudomonas sp.(KR013205.1) 833



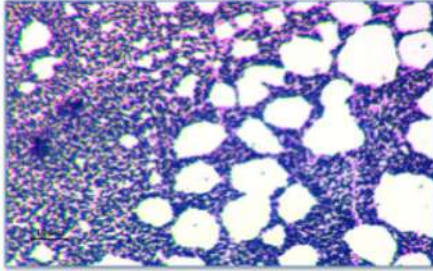
Pseudomonas sp. (KRO13205.1) 911



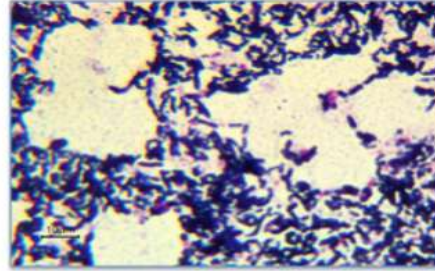
Bacillus cereus (MH130346.1) 912



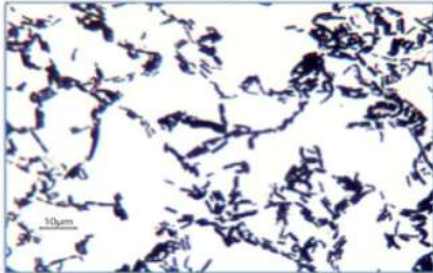
Bacillus licheniformis (MK418380.1) 9312



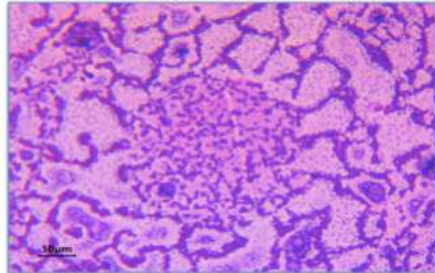
Bacillus wiedmannii (LC515603.1) 1033



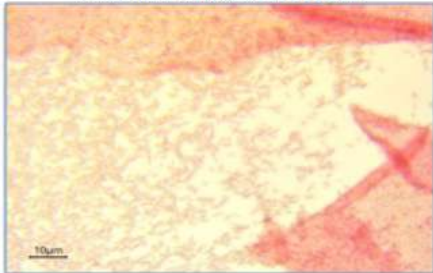
Bacillus wiedmannii (LC515603.1) 1034



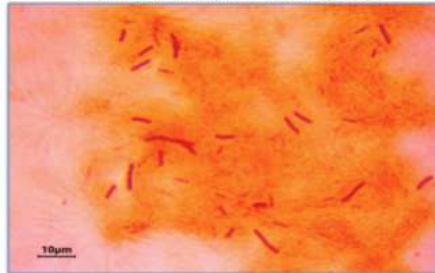
Bacillus licheniformis (MK603131.1) 1111



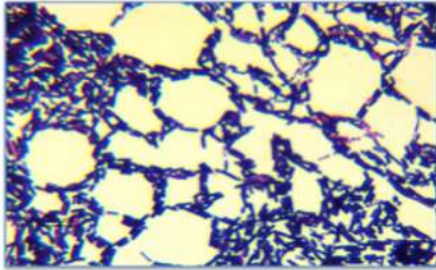
Rhizobium sp. (JQ689943.1) 1113



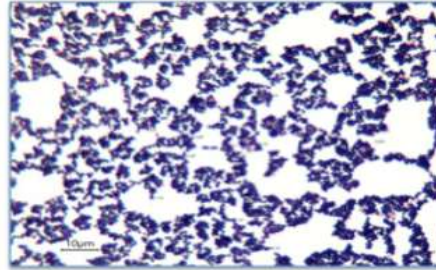
Bacillus subtilis (MK575023.1) 1133



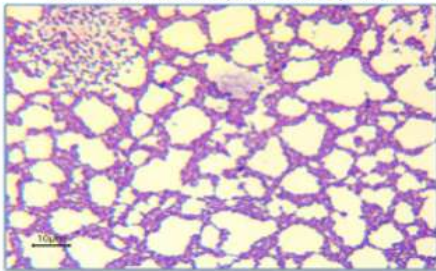
Bacillus wiedmannii (LC515603.1) 1137



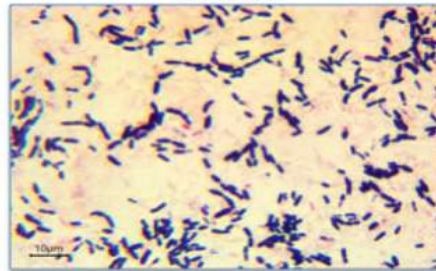
Bacillus licheniformis (MT192715.1) 1211



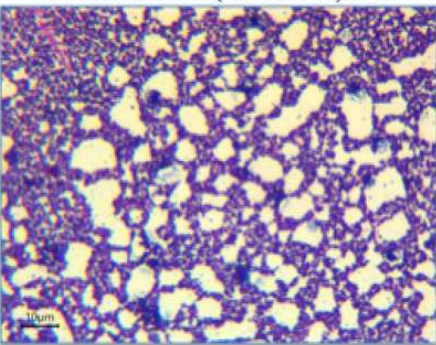
Bacillus nakamurai (mk554504.1) 1223



CEPA 1227



Microbacteriaceae (MT102977.1) 1239



Bacillus thuringiensis (MN135296.1) 1331

