



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO.**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA.

**“Microbiota Bacteriana Asociada a
Anuros y su Relación como Indicador de
la Calidad Ambiental en el Parque
Ecológico Niltze Tonatico, Estado de
México”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G A

PRESENTA

ARITZEL RUIZ MARTÍNEZ

DIRECTORA DE TESIS

Dra. Sandra Fabiola Arias Balderas

+



Los Reyes Iztacala, Estado de México, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A Guadalupe Martínez.

*A Alberto Ruiz, hasta el
cielo.*

Agradecimientos

A mi madre, nunca me alcanzará la vida para agradecer todo lo que haces por mí, el trabajo que siempre has hecho para que no faltará nada, todo lo que he logrado ha sido por tu gran esfuerzo y dedicación, gracias por brindarme una buena educación y todos los valores que me has inculcado a lo largo de mi vida, por abrirme las puertas al mundo de la ciencia. No existen palabras para decir lo mucho que te admiro y lo eternamente agradecida que estoy contigo. Siempre confiaste en todo lo que soñé, me cuidaste y me guiaste hasta aquí. Gracias por todos tus consejos, tus regaños, por quererme tanto y por ponerme los pies sobre la tierra cuando hace falta. Eres y serás mi más grande inspiración. Te amo mamá.

A mi padre, por tus consejos y enseñanzas hasta donde la vida te lo permitió, nunca te olvido. Gracias, hasta donde quiera que estés.

A mi abuela Cristina por ser mi segunda madre por cuidarme, alentarme y siempre estar. A mi abuelo Gerardo por estar presente en todo momento. Los amo.

A mis tíos Gerardo, José Luis y Oscar por todos sus consejos, regaños y su apoyo incondicional. Los quiero mucho.

A mis primos Aldair, Luis y Celeste por siempre apoyarme y estar cuando las cosas se han puesto difíciles, siempre estaré para ustedes. Los amo.

A Ana María Taxis, amiga de la infancia y hermana. Gracias por todos estos años de amistad, por tu apoyo incondicional, por tus consejos y tus regaños, me haces ser una mejor persona, Te amo.

A mis amigas y amigos de la Facultad . Elizabeth gracias por todas esas pláticas por siempre alentarme y aplaudirme por todos los logros y también por los regaños cuando las cosas no son las correctas. Ana Yañez por todos los momentos vividos en las clases y fuera de ellas por ser un apoyo incondicional. Daniela por siempre alentarme a ser una buena estudiante, gracias por tu amistad. A Esteban, Oscar, Jorge y Javier. A todas y todos gracias por las buenas pláticas, el apoyo, los momentos en la facultad y fuera de ella y las prácticas de campo. La carrera no hubiese sido la misma sin ustedes. Los quiero mucho

A mi asesora la Dra. Sandra por todos los conocimientos que ha compartido conmigo, por su amistad, su tiempo y paciencia para explicarme las cosas, por los momentos que hemos pasado en campo y por compartir su pasión por la herpetofauna. Gracias por apoyarme incondicionalmente en la realización de este proyecto. Te quiero mucho Sandrita.

A mis compañeros de muestreo, gracias por esas colectas nocturnas, por las fogatas y los buenos momentos en Tonatico.

Al Dr. Diego por brindarme un espacio en su laboratorio y por sus conocimientos compartidos. Al igual que a su equipo de trabajo de laboratorio. Gracias por el tiempo y la paciencia.

A Don Luis, por abrírnos las puertas del Parque y por apoyarnos en la realización de este proyecto.

A la UNAM y a mi amada FES Iztacala por ser mi casa de estudios todos estos años.

ÍNDICE

Resumen.....	1
1. Introducción.....	2
1.1 Orden Anura.....	2
1.2 Situación de los anfibios	3
1.3 Causas del declive en anfibios.....	3
1.4 Enfermedades en anfibios	5
1.5 Anfibios como especies bioindicadoras	6
2. Antecedentes	8
3. Objetivos	10
3.1 Objetivo general.....	10
3.2 Objetivos particulares.....	10
4. Justificación.....	11
5. Descripción de la zona de estudio.....	12
6. Materiales y métodos	14
6.1 Trabajo de laboratorio previo al trabajo en campo.....	14
6.2 Trabajo en campo	15
6.3 Trabajo de laboratorio	17
6.4 Análisis estadístico.....	22
6.4.1 Análisis de Varianza y de Holm-Sidak	22
7 Resultados	22
7.1 Resultados de la microbiota bacteriana asociada a Anuros.....	22
7.2 Microbiota bacteriana asociada a cada especie de Anuros	24

7.3 Análisis de Temperatura y pH asociados al microhábitat de los Anuros del parque.....	27
7.4 Análisis bacteriológicos de la calidad del agua de los diferentes puntos del parque.....	28
7.5 Análisis de Varianza y prueba Holm- Sidak.	29
8. Discusión.....	31
9. Conclusiones.....	38
10. Bibliografía	40
ANEXO I.....	46
ANEXO II.....	48
ANEXO III.....	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Parque Ecológico Niltze en el Municipio de Tonatico	13
Figura 2 .Mapa del municipio.....	13
Figura 3. Medio de transporte.....	14
Figura 4. Muestras de campo Toma de la muestra en boca con hisopo estéril a los Anuros encontrados.	16
Figura 5. Muestras de campo	16
Figura 6. Sembrado de muestras en medios de cultivo.....	18
Figura 7. Resembrado de cepas	19
Figura 8. Sembrado de <i>Vibrio cholerae</i>	19
Figura 9. Pruebas bioquímicas positivas.	20
Figura 10. Presencia de coliformes.	21
Figura 11. Porcentaje de las especies de bacterias encontradas en boca, piel y cloaca.....	23
Figura 12. Bacterias diferenciadas por organismo colectado.	25

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Bacterias encontradas en la boca, cloaca y piel encontradas por especie de Anuros.....	24
Tabla 2. Especies bacterianas diferenciadas	26
Tabla 3. Relación promedio de pH y temperatura.....	27
Tabla 4. Coliformes totales por NMP con 95% del límite de confianza.....	28
Tabla 5. Presencia de coliformes de estanque muestreado.....	28
Tabla 6. Prueba de Holm-Sidak.....	30

Resumen

En México la herpetofauna constituye una parte importante de la fauna que alberga el país, en específico los anfibios que presentan un alto grado de endemismo. Actualmente, en México 169 especies de anfibios se encuentran amenazadas, uno de los principales factores de este problema se debe a las actividades antropogénicas. Debido a su piel altamente permeable y a sus ciclos de vida, los anfibios se ven afectados por las alteraciones en el ambiente, por esto se les considera buenos indicadores de la calidad ambiental. Es por ello que se analizó la microbiota bacteriana asociada a Anuros y su relación como indicador de la calidad ambiental del Parque Ecológico Niltze en Tonatico, Estado de México. Se realizaron tres salidas en diferentes meses dentro de los años 2019 y 2020, en donde se colectaron 22 organismos de 7 especies diferentes del Orden Anura, a los cuales se les realizó un frotis bucal, cloacal y de piel, registrando 9 especies diferentes de bacterias las cuales fueron: *Citobacter sp.*, *Enterobacter sp.*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella tiphy*, *Serriata marscens*, *Shigella flexneri*, *Klebsiella pneumoniae* y *Vibrio cholerae*. Así mismo, se tomaron algunos parámetros fisicoquímicos los cuales fueron Temperatura y pH del agua para evaluar la calidad de los microhábitats en donde se encontraban los organismos, obteniendo valores para temperatura de 15°C y pH de 7, lo que se considera valores óptimos para una buena calidad de agua. Se hicieron análisis de coliformes fecales al agua de cuatro charcas en donde se encontraron los anuros para evaluar su calidad por el método de NMP en donde únicamente dos charcas obtuvieron valores positivos a la presencia de coliformes, sin embargo los valores obtenidos se encuentran dentro de lo establecido por las Normas Mexicanas (NOM-001-SEMARNAT-1996). De acuerdo a lo observado y a los resultados obtenidos en campo y procesados en el laboratorio, los anuros analizados presentaron microbiota bacteriana similar a la documentada por otros estudios, lo que representa que se trata de microbiota bacteriana propia de los anuros. Por otra parte, los parámetros fisicoquímicos evaluados como pH, Temperatura y Coliformes totales no presentaron rangos fuera de los establecidos lo que no provocó que las condiciones del hábitat se modificaran para el crecimiento de bacterias.



1. Introducción

1.1 Orden Anura

México cuenta con una localización geográfica e historia geológica compleja que dan como resultado una gran variación de topografías y climas que al mezclarse crean diversas condiciones ambientales y microambientales para el desarrollo de una variedad de hábitats y especies. Dentro de su amplia fauna, la herpetofauna de México es una de las más importantes (Ramírez, 2019); tal es el caso del Orden Anura. Los organismos de este orden se encuentran en hábitats acuáticos, terrestres, fosoriales y arborícolas en casi todos los continentes (Parra *et al.* 2014). En los ambientes estacionales como en el caso de los bosques tropicales caducifolios hay una influencia de factores ambientales sobre su actividad y su presencia, entre los que se encuentran principalmente la precipitación y la humedad y a su vez la disponibilidad de recursos (Leyte *et al.* 2018).

Los organismos del orden Anura, presentan extremidades posteriores largas, tronco corto y no exhiben la cola, con excepción de los machos de una especie. Sin embargo, pueden presentar diferencias en su morfología dependiendo de su forma de vida, los que viven en climas áridos o estacionales son cavadores pequeños por lo que presentan hocicos curvos, cabezas anchas y cuerpos globulares. (Parra *et al.* 2014). En cuanto a los modos de reproducción de los anuros, la mayoría presentan fecundación externa, tienen un abrazo sexual (amplexo) y su ovoposición es en charcas, sobre la vegetación, suelo o excavaciones. Casi siempre presentan metamorfosis, pero algunos pueden presentar desarrollo directo (Parra *et al.* 2014).



1.2 Situación de los anfibios

En México la herpetofauna constituye una parte importante de la fauna que alberga el país, especialmente los anfibios los cuales contribuyen a que México sea considerado un país megadiverso por su alto grado de endemismo cercano al 60% de sus especies (Parra *et al.*, 2014). Expresado en números existe un total de 252 especies endémicas en México. Sin embargo los anfibios son el mayor número de vertebrados que aparecen mencionados por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) como especies en disminución o en peligro de extinción. Su evaluación en 2017 por esta organización (UICN) fue que el 41% de las especies de anfibios se encontraba en peligro de extinción, considerando esta desaparición como la sexta gran extinción global en curso (Val Richard, 2019)

1.3 Causas del declive en anfibios

Se considera que en México 164 especies de anfibios están amenazadas o críticamente amenazadas y dentro de los factores causantes de esto se encuentran los de tipo antropogénico, como la destrucción de su hábitat, explotación por comercio ilegal, introducción de especies exóticas, así como enfermedades infecciosas emergentes (Parra *et al.*, 2014). Los cambios antropogénicos en el ambiente como la contaminación en cuerpos de agua hace que los anfibios sean sensibles a las sustancias tóxicas que se encuentran en ella, dado que es donde pasan un largo periodo de tiempo y por consecuencia afecta las condiciones en su piel (Chaparro- Herrera *et. al.*, 2020). Esto promueve a que sean factores principales para las enfermedades en anfibios, ya que la diversidad de bacterias en la piel se ve directamente influenciada por las comunidades microbiales presentes en el ambiente y así mismo las condiciones climáticas que influyen en la composición de la piel de los anfibios (Familiar *et al.*, 2017).



La conductividad eléctrica, altas concentraciones de Nitratos, Nitritos, Fosfatos, Cloruro, Amonio, Metales pesados, grandes niveles de Materia Orgánica, han sido documentados como los contaminantes más dañinos en anfibios (Calderon *et. al.*, 2019) ocasionando malformaciones, retardo en su desarrollo y peso reducido. No obstante, las bacterias en los cuerpo de agua también juegan un rol importante ya que los parámetros fisicoquímicos y la dinámica de las comunidades bacterianas son esenciales para entender las condiciones del ambiente en donde se encuentran los organismos (Jalal *et. al.*, 2012)

Los anfibios se encuentran entre los vertebrados que son particularmente vulnerables a la contaminación debido a su piel altamente permeable y su ciclo de vida bifásico comprendido en fases acuáticas y terrestres (Preuss *et al.*, 2020). Durante la fase larvaria generalmente en el agua y la adulta en la tierra su respiración es principalmente por medio de la piel, la cual aumenta la posibilidad de que sean afectados por contaminantes u otras sustancias disueltas en agua o suelo y esto permite que se infecten con parásitos que penetran en el cuerpo por medio de las branquias o por la piel (Parra, *et. al.*, 2014). Estas características les han valido a los anfibios para ser considerados como bioindicadores de la calidad ambiental ya que se considera una especie como bioindicadora aquellas que son sensibles al ambiente y que tienen la capacidad de responder a variaciones de factores abióticos y bióticos del ecosistema (González, 2014).



1.4 Enfermedades en anfibios

Las infecciones bacterianas en anfibios traen en consecuencia otros problemas como lesiones traumáticas por situaciones insalubres que acarrear invasores secundarios promotores de infecciones virales y micóticas en la piel. En este sentido, así como otros animales ectotérmicos la mayoría de las bacterias que afectan a los anfibios son Gram-negativas; sin embargo, bacterias Gram-positivas también pueden provocar enfermedades significativas (Densmore *et al.*, 2007) aunque son menos comunes.

Existen algunas infecciones ocasionadas por bacterias como *Aeromonas* spp., hongos como *Saprolegnia* y algunos helmintos, estas infecciones pueden causar malformaciones en el cuerpo y ocasionar la muerte de los organismos y por ende el declive de las poblaciones (Santos, 2004). Otras enfermedades que se encuentran en los anfibios son:

Dermatosepticemia bacteriana. Conocida generalmente como la enfermedad de las patas rojas, la cual es una enfermedad bacteriana asociada a eritema cutáneo que con mayor frecuencia se localiza en el vientre o en las extremidades, otros signos que se reflejan por esta enfermedad incluyen anorexia, hinchazón, edema, derrames celómicos, erosiones epidérmicas, úlceras y necrosis. El agente etiológico implicado en esta enfermedad generalmente es *Aeromonas hydrophila* pero pueden estar involucrados otros microorganismos como pseudomonas, enterobacterias tales como *Citrobacter*, *Proteus* y *Salmonella* y algunas bacterias Gram- Positivas como *Streptococcus* y *Staphylococcus* (Densmore *et al.*, 2007)

Flavobacteriosis. Es una enfermedad bacteriana asociada con el género *Flavobacterium* son bacterias Gram-negativas las cuales producen pigmentos amarillos patógenos presentes generalmente en ambientes acuáticos. Los signos macroscópicos que muestra la presencia de flavobacteriosis incluyen derrames en los sacos linfáticos, hidroceloma, edema lingual o corneal, panofalmitis y congestión visceral. Las especies patógenas que se han reportado en anfibios



incluyen *Flavobacterium oderans*, *Flavobacterium indolo- genes* y *Flavobacterium meningosepticum* (Densmore *et al* 2007)

Salmonelosis. El género *Salmonella* son organismos Gram-Negativos. En esta enfermedad su transmisión es más viable por el medio acuático. Comienza colonizando el intestino delgado de los anfibios y los organismos que se encuentran afectados presentan anemia, letargia, anorexia, septicemia y enteritis (Jifkins, 2017)

Cólera. Se presenta por organismos Gram- Negativos del género *Vibrio* presentes en los cuerpos de agua, los cuales son anaerobios facultativos, halófilos no formadores de esporas. La especie más representativa de este género es *V. cholerae* y puede causar enteritis, diarrea, pérdida de peso, petequias, deshidratación y septicemia (Jifkins, 2017)

1.5 Anfibios como especies bioindicadoras

Como se mencionó anteriormente, la piel de los anfibios que es altamente permeable, permite la conexión del organismo y el ambiente y esto hace muy fácil que los anfibios reflejen sanidad del hábitat, dado que si el medio en donde se encuentran está contaminado sus poblaciones se verán afectadas, aunado a esto su doble ciclo vital acuático y terrestre los hace vulnerables a las alteraciones producidas en los dos medios en que habitan, sumando a, estos organismos ocupan posiciones diversas en la cadena trófica, lo que puede mostrar afectaciones a diferentes escalas (Bosch 2003; Aguillón *et al.*, 2007).



El uso de bioindicadores como los anfibios, resultan como una herramienta que permite evaluar la presencia y extensión de contaminantes de un sitio en específico y monitorear las tendencias temporales en concentraciones de los efectos biológicos en el organismo. Para usar un organismo como bioindicador éste debe ser fácil de manejar, tener una amplia distribución geográfica, sensible a la perturbación de los ecosistemas, no ser organismos de importancia comercial y que tengan baja morbilidad (Rojas *et al.* 2019) Por lo que desde 1989 los anfibios han sido considerados como buenos indicadores biológicos en sus hábitats, lo que los hace vulnerables a los cambios ambientales (Trevor *et al.*, 2005).



2. Antecedentes

Debido a la escasa información que existe sobre el tema de la microbiota bacteriana en anuros, no se cuenta con antecedentes directos, sin embargo se realizaron búsquedas en bases de datos como: Biological abstracts, Biological sciences. BioOne y Science Direct encontrándose lo siguiente:

Lambert (1977) realizó una evaluación sobre los efectos ambientales del derrame en un almacén de plaguicidas en el cual utilizaron reptiles y anfibios como bioindicadores. El objetivo principal fue establecer el área y los niveles de contaminación del derrame así como el alcance del impacto ambiental. Concluyendo que las ranas resultaron extremadamente sensibles a los pesticidas presentes en el suelo. Sin embargo, no se presentaron anomalías esqueléticas por las sustancias químicas, lo que indicó que los residuos de insecticidas no atravesaron el estrato rocoso para entrar en el agua subterránea.

Rohr *et. al.*, (2008), afirmó que las alteraciones humanas han provocado extinciones masivas, en el cual los anfibios han sido los vertebrados mayormente amenazados. Además de enfermedades emergentes como quitridiomycosis, entre otras causas. Su análisis refuerza y proporciona mayor evidencia que la pérdida de biodiversidad también es a causa del cambio climático, ya que la temperatura puede jugar un rol importante para la propagación de algunas enfermedades.

Un estudio realizado por Jifkins (2017) donde determinó los factores desde el punto de vista bacteriano que influyen en el desarrollo de *Ambystoma mexicanum* en el Lago de Xochimilco, concluye en que no se registraron patologías provocadas por las bacterias que se encontraron en el agua residual lo que confirmo un impacto positivo entre la interacción con las comunidades microbiológicas que generan la mucosas y microflora de los anfibios para combatir patógenos presentes en el medio ambiente.



Preuss *et al.*, (2020), evaluaron el riesgo de enfermedades en poblaciones de la rana arborícola *Dendropsophus minutus*, en estanques utilizados para la cría de cerdos y peces y de igual manera en estanques no utilizados para la cría de cerdos y peces. Así mismo, se midieron parámetros para la calidad del agua como coliformes fecales, nitratos y Temperatura. Concluyendo que la presencia masiva de coliformes fecales dentro de ambientes acuáticos alteran el microbioma de la piel de los anfibios.



3. Objetivos

3.1 Objetivo general

- Analizar la microbiota bacteriana asociada a Anuros y su relación como indicador en la calidad ambiental del parque Ecológico Niltze Tonicato, Estado de México.

3.2 Objetivos particulares

- Aislar e identificar las bacterias asociadas a Anuros en boca, cloaca y piel.
- Diferenciar la microbiota bacteriana asociada a cada especie de anuros encontrada.
- Medir parámetros fisicoquímicos (Temperatura y pH) asociados al microhábitat de los anuros del parque.
- Relacionar la diversidad de bacterias encontradas en los Anuros y las registradas en el ambiente acuático con la finalidad de conocer la calidad ambiental que el Parque brinda a estos organismos.



4. Justificación

Una de las principales causas del declive de anfibios han sido las actividades antropogénicas ya que pueden alterar directamente la estructura de la comunidad en donde habitan a través de mecanismos abióticos y bióticos incluyendo los cambios en los microclimas locales y las interacciones entre especies (Becker *et al.*, 2016) y así propiciar el surgimiento de enfermedades en ellos. Por lo que, sabiendo la relación de la microbiota asociada a anfibios se puede favorecer la supervivencia de los organismos (Douglas *et al.*, 2016) al conocer primeramente la microbiota natural y la potencialmente nociva y de este modo se pueden tomar medidas de mitigación o biorremediación en los sitios donde habitan. Además de reconocer la relación de las bacterias encontradas en los organismos junto con la calidad ambiental. Así como la calidad del agua puesto que es un problema que las actividades humanas generen vertimientos de aguas residuales a los cuerpos de agua en donde se encuentran los anfibios, pudiendo propiciar la presencia de microorganismos que causan enfermedades, como protozoarios, virus y bacterias (Jifkins, 2017). Del mismo modo al conocer estos aspectos se podría dar respuesta ante la presencia de contaminantes y permitiría en mediano plazo realizar la clasificación sanitaria, determinación de criterios para las normas de calidad, identificación de contaminantes, procesos de tratamiento y estudios epidemiológicos, así como categorías de vulnerabilidad de los anfibios (Larrea *et al.*, 2013).



5. Descripción de la zona de estudio

El Parque Ecológico Niltze, se encuentra ubicado en el municipio de Tonatico, Estado de México entre los paralelos 18° 43' y 18° 50' de latitud norte, los meridianos 99° 43' de longitud oeste, con una latitud entre 1 200 y 2 200m (Figura 1)(INEGI, 2009) . Limitando al norte y poniente con el municipio de Ixtapan de la Sal, al sur con el municipio de Pilcaya, al oriente con el municipio de Zumpahuacán (Figura 2 y 3) (González, 2017). Tonatico pertenece a la región hidrológica de Balsas y a la cuenca hidrológica del Río Grande Amacuzac y la subcuenca de Río Alto Amacuzac (INEGI,2009) y forma parte del acuífero 1504 “Tenancingo” (CONAGUA, 2020) El Río San Jerónimo atraviesa al municipio de Tonatico desembocando en el Río Amacuzac (Martínez, 2015)

En el municipio de Tonatico se presentan dos tipos de clima, el primero que es semicálido subhúmedo con lluvias en verano con humedad media el cual se presenta en casi todo el territorio y el segundo clima que es cálido subhúmedo con lluvias en verano y humedad media el cual se presenta en una pequeña porción en el extremo sur del municipio. La temperatura promedio es de entre 18 y 24 °C. Su temperatura más elevada se encuentra entre los meses de Abril y Mayo y las temperaturas más bajas entre los meses de Noviembre, Diciembre y Enero (Martínez, 2015)

La vegetación en Tonatico es bosque, pastizal y selva (INEGI, 2009). En las partes altas se encuentran cedro criollo (*Cedrela odorata*), huajes (*Leucaena leucocephala*), tepehuajes (*Lysiloma acapulcensis*) y *Ficus insípida*, copales, (*Burseraceae*), zompantles (*Erythrina americana*) (González, 2017).



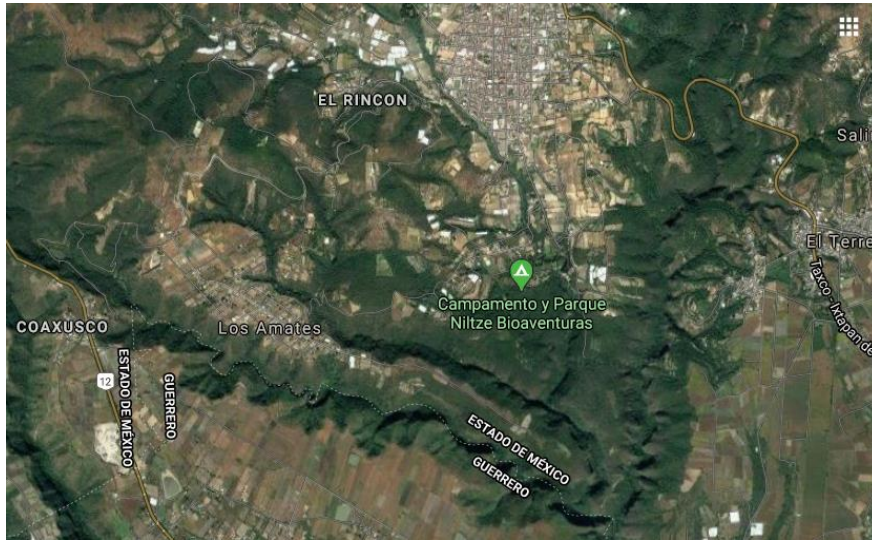


Figura 1. Parque Ecológico Niltze en el Municipio de Tonalico, Estado de México (Google Earth, 2020)

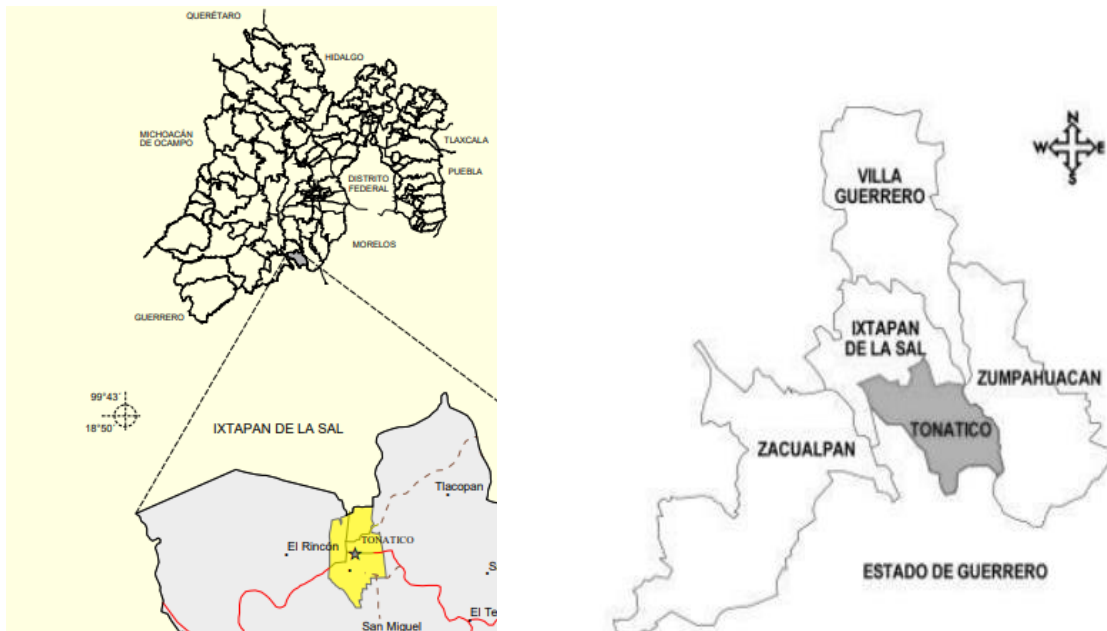


Figura 2 .Mapa del municipio Ubicación de Tonalico en el Estado de México entre los paralelos 18° 43' y 18° 50 ' de latitud norte, los meridianos 99° 43' de longitud oeste, con una latitud entre 1 200 y 2 200m. (INEGI, 2009) (H. Ayuntamiento, 2013)



6. Materiales y métodos

6.1 Trabajo de laboratorio previo al trabajo en campo.

Se prepararon medios de transporte AMIES (Figura 3), el cual es una modificación del Medio Cary Blair, con la finalidad de llevarlos al muestreo en campo en donde se colocaron los hisopos con su respectiva muestra siguiendo la metodología empleada por Garnica (2017), para el cultivo o sembrado de bacterias. Se realizó la preparación de medios de cultivo (Agar Mac Conkey, Agar Dextrosa y Papa y Agar Eosina y Azul de Metileno) para sembrar las muestras obtenidas en campo (Método de preparación en ANEXO I).



Figura 3. Medio de transporte. Medio de transporte AMIES en donde se colocaron los frotis respectivos a la boca, cloaca y piel de anuros del Parque Ecológico Niltze en Tonicaco, Estado de México



6.2 Trabajo en campo

Se realizaron 3 salidas a campo durante los meses de Octubre del 2019 y Febrero y Octubre del 2020, con una duración de tres días cada una, dichos muestreos se realizaron con la técnica de colecta oportunista, haciendo colectas nocturnas con un horario de observación de 21:00-02:00h para tener una observación de anuros activos, se colectaron los organismos realizando caminatas y búsquedas al azar en zonas de riego, barrancas y cuerpos de agua. Asimismo, revisando microhábitats en donde se pudiesen encontrar, como bajo rocas, bajo troncos, pasto y dentro de las charcas, el esfuerzo por captura fue de cinco personas/ 5 horas /3 días en promedio.

Cada organismo se capturó manualmente o por medio de redes de mango largo, durante los muestreos se utilizaron lámparas, para la manipulación de los organismos se usaron guantes de látex o de nitrilo estériles y posterior a la manipulación de los organismos se lavó cada guante con alcohol para evitar la proliferación de alguna enfermedad entre los organismos. A cada organismo se le realizó un frotis con un hisopo estéril diferente por cada zona (cloaca, boca y piel) (Figura 4) y con previo enjuague con agua destilada a los organismos, los hisopos se colocaron por zona con su correcto etiquetado en el medio de transporte AMIES previamente preparado (Figura 5). Se identificó por especie a cada organismo y se le tomaron fotografías, se observó si tenían alguna anomalía física que manifestara alguna enfermedad, se midieron y posteriormente se liberaron.

Al mismo tiempo, se tomaron parámetros fisicoquímicos como pH por medio de tiras de pH y con ayuda de un termómetro se midió la temperatura del sustrato y corporal de donde se encontraron los organismos y finalmente se tomaron cuatro muestras de agua de diferentes charcas en donde se encontraba la mayor presencia de organismos para realizar un análisis de coliformes en agua por medio de la técnica del Numero Más Probable.





Figura 4. Muestras de campo Toma de la muestra en boca con hisopo estéril a los Anuros encontrados.



Figura 5. Muestras de campo Hisopos de los frotis dentro del medio de transporte, realizados a los anuros.



6.3 Trabajo de laboratorio

Las muestras de los frotis de los organismos por su zona (cloaca, boca y piel) se sembraron en los medios de cultivo Agar MacConkey, Agar Dextrosa y Papa y Agar Eosina y Azul de Metileno (Figura 6), separados por zonas y se incubaron por 24 horas a 37°C. Se seleccionaron las colonias diferentes a simple vista para volver a resembrarlas en medio de cultivo en el que creció, pero esta vez por separado (Figura 7). Por cada colonia diferente se realizó el tren de pruebas bioquímicas (Figura 8) para la identificación de las bacterias, se sembraron en tubos de rosca por picadura y estriado en Medio TSI (Agar Hierro y Triple azúcar) MIO (Movilidad-Indol y Ornitina) por picadura hasta el fondo, LIA (Lisina- Hierro) por doble picadura hasta el fondo y Citrato de Simmons por picadura hasta el fondo y estriado en la superficie, todo esto llevado a cabo en condiciones asépticas e incubándose por 24 horas a 37°C. (Preparación de las pruebas bioquímicas en ANEXO II). Con los resultados positivos y negativos derivados de las pruebas bioquímicas se creó un perfil bioquímico por cada bacteria la cual fue corroborada con literatura específica.



Para comprobar la presencia del género *Vibrio* se realizó un enriquecimiento en Agua peptonada alcalina de las muestras obtenidas en campo incubándolas por 24 horas a 37°C para posteriormente sembrarlas en Agar TCBS (Tiosulfato Citrato Sales Biliares de Sacarosa) incubando por 24 horas a 37°C, revisando posterior a la incubación el crecimiento

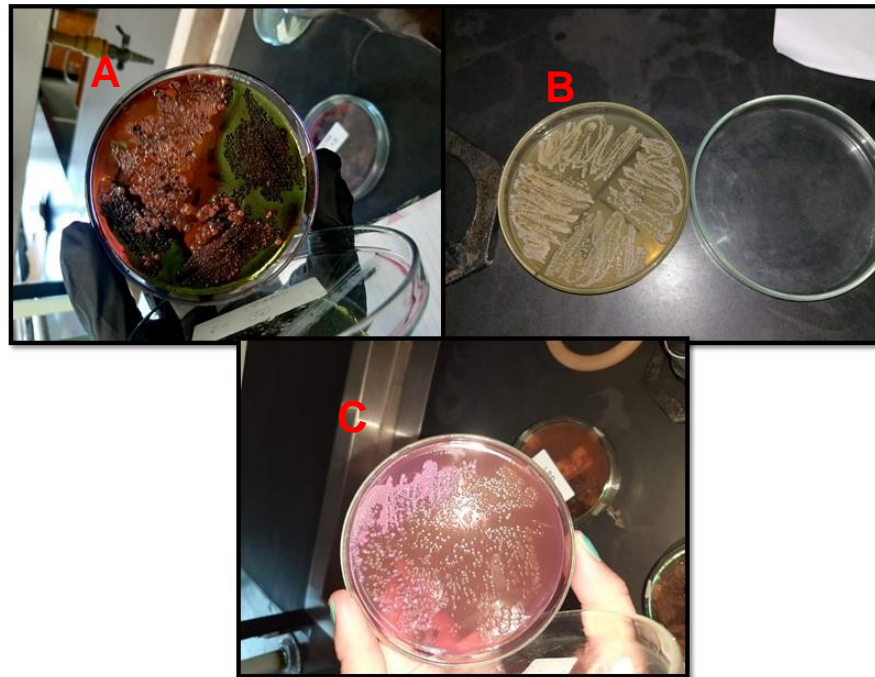


Figura 6. Sembrado de muestras en medios de cultivo Muestras de los frotis sembrados en medio de cultivo: A- Agar Eosina y Azul de Metileno, B-Agar Dextrosa y Papa y C- Agar MacConkey.



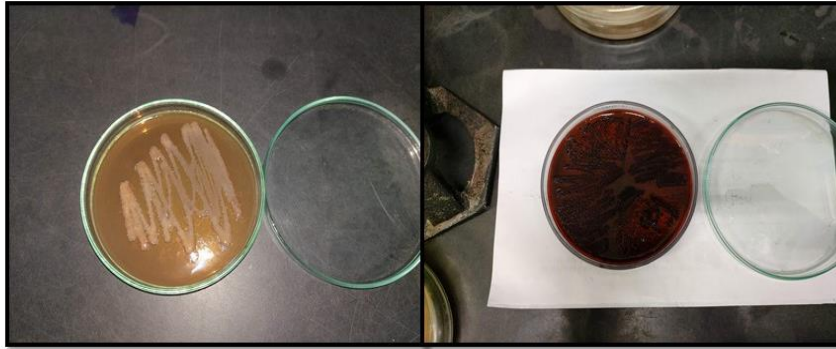


Figura 7. Resembrado de cepas Resiembrado de las cepas en medios de cultivo Agar Dextrosa y Papa y Agar Eosina y Azul de Metileno



Figura 8. Sembrado de *Vibrio cholerae*. Sembrado de *Vibrio cholerae* en Agar TCBS posterior al enriquecimiento de Agua Peptonada.





Figura 9. Pruebas bioquímicas positivas Prueba Citrato de Simmons, LIA y TSI positivas.

Las muestras de agua se mantuvieron en hielo hasta el análisis en el laboratorio, para el análisis de coliformes. En condiciones asépticas se extrajo una alícuota de 10 mL en donde se realizaron 3 diluciones de agua de dilución (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}), la cual es una solución de fosfatos y sulfato de magnesio 1:3. Se realizó una serie de 9 tubos de ensayo por cada charca de muestreo con nueve mililitros de agua de dilución, se le adicionó un mililitro de las muestras de agua tomadas en campo por cada tubo. Finalmente, a una serie de tres tubos de ensayo con nueve mililitros de Caldo Lactosado se le agregó un mililitro de agua tomada de las diluciones (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}), se incubaron los tubos a 37°C por 24 horas. Los tubos que se consideraron positivos fueron por la presencia de turbidez y producción de gas como lo indica la técnica de Camacho *et. al.* (2009). Se realizó la prueba confirmativa en la cual con un asa bacteriológica se transfirió agua de los tubos anteriormente positivos a tubos con verde Bilis Brillante al 2% (procedimiento ANEXO III) en condiciones de asepsia se incubaron a 37°C por 24 horas. A los tubos que se les consideró positivos después de la incubación por presencia de turbidez y producción de gas se determinó el NMP (Número más Probable) de microorganismos coliformes fecales, transfiriendo con un asa bacteriológica a tubos de ensayo con



Caldo EC (*Escherichia Coli*) en condiciones de asepsia y se incubaron a 37°C por 24 horas, posterior a la incubación se tomó como resultado positivo a los tubos que presentaron turbidez y producción de gas (Figura 10).

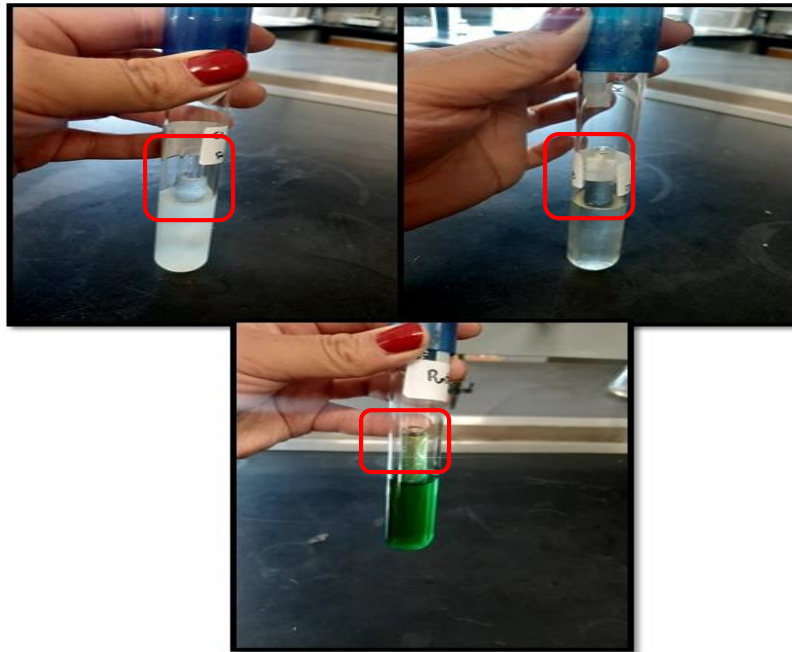


Figura 10. Presencia de coliformes. Los tubos muestran turbidez y presencia de gas señalado en marco rojo.



6.4 Análisis estadístico

6.4.1 Análisis de Varianza y de Holm-Sidak

Se aplicó un análisis de varianza ANOVA con la finalidad de conocer si existían diferencias entre la zona de frotis con respecto a las bacterias encontradas y las especies de anuros, posteriormente se realizó una prueba de Holm-Sidak para conocer en qué grupos hubo esas diferencias. Esta prueba ha mostrado ser eficiente tanto para comparaciones por pares como para comparaciones con un grupo control. Dichos análisis se realizaron con el paquete estadístico Sigmaplot para Windows, Versión 11.0 Build 11.0.0.77, 2008.

7. Resultados

7.1 Resultados de la microbiota bacteriana asociada a Anuros

Se realizaron un total de 66 frotis a 22 organismos durante dos muestreos en temporada de lluvias y un solo muestreo en temporada de secas. Se encontraron un total de 7 especies diferentes del Orden Anura. Dentro de las bacterias encontradas en los organismos se registraron 9 especies diferentes: *Citrobacter* sp., *Enterobacter* sp., *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella tiphy*, *Serriata marcenscens*, *Shigella flexneri*, *Klebsiella pneumoniae* y *Vibrio cholerae*, cabe resaltar que todas estas son bacterias Gram- negativas. Como se muestran en la Figura 11 y Tabla 1.

La mayoría de los organismos colectados presentaron bacterias similares, entre ellas siendo las especies bacterianas con mayor presencia *Enterobacter* spp. en 5 especies, *Salmonella tiphy* que se presentó en seis especies y *Escherichia coli* la cual se encontró en todas las especies. En contraste se encuentra *Citrobacter* sp. la cual se encontró solamente en un organismo (Figura 11). Sin embargo, las bacterias que se encontraron con mayor frecuencia no representan un riesgo debido a que se tiene reportado que pertenecen a la microbiota bacteriana natural de estos



organismos. *Vibrio cholerae* por su parte presentó baja presencia y solamente se encontró en *Rana zweifeli* y *Rana forreri*.

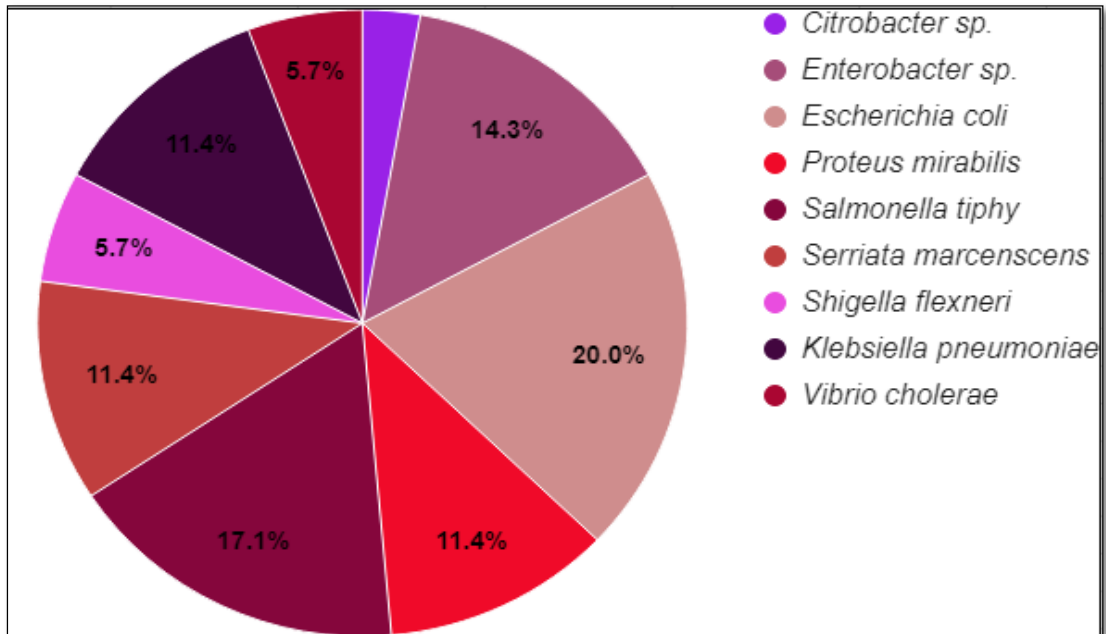


Figura 11. Porcentaje de las especies de bacterias encontradas en boca, piel y cloaca de 7 especie de Anuros.



Tabla 1. Bacterias encontradas en la boca, cloaca y piel encontradas por especie de Anuros.

Especies de Anuros	Bacterias encontradas en la boca, cloaca y piel
<i>Craugastor pygmaeus</i>	<i>Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli.</i>
<i>Hypopachus variolosus</i>	<i>Enterobacter sp. Salmonella tiphy. Escherichia coli.</i>
<i>Incilius occidentalis</i>	<i>Enterobacter sp. Escherichia coli, Salmonella tiphy. Serriata marcescens.</i>
<i>Leptodactylus melanonotus</i>	<i>Escherichia coli, Salmonella typhi, Klebsiella pneumoniae, Proteus mirabilis.</i>
<i>Rana forreri</i>	<i>Escherichia coli, Salmonella typhi, Serriata marcescens, Enterobacter sp., Proteus mirabilis, Vibrio cholerae.</i>
<i>Rana zweifeli</i>	<i>Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Proteus mirabilis, Salmonella tiphy. Enterobacter sp., Serriata marcescens, Vibrio cholerae, Shigella flexneri.</i>
<i>Rhinella horribilis</i>	<i>Enterobacter sp. Salmonella typhi. Serriata marcescens, Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli, Shigella flexneri, Proteus mirabilis, Citrobacter sp.</i>

7.2 Microbiota bacteriana asociada a cada especie de Anuros

En la Figura 12 se muestra la frecuencia de las diferentes bacterias presentes por cada especie de Anuros y en la Tabla 2 se muestran las bacterias por cada zona en que se realizó el exudado (boca, cloaca y piel). Las bacterias que presentaron mayor frecuencia en todas las zonas de frotis de los organismos fueron *Enterobacter sp.*, *Escherichia coli* y *Salmonella tiphy*. Sin embargo, las bacterias que tuvieron una menor frecuencia fueron *Serriata marcescens* y *Citrobacter sp.*, esta última solamente tuvo una sola presencia en la zona de la bucal de *Rhinella horribilis*. En el caso de *Craugastor pygmaeus* solo se encontró un organismo, registrando solamente bacterias en la zona de la piel debido a que estaba muy pequeño para tomar la muestra de boca y cloaca (Figura 12). La especie con mayor número de especies bacterianas registradas fue *Rana zweifeli* la cual presenta las mismas bacterias en las tres zonas. *Vibrio cholerae* se presentó tanto en boca cloaca y piel de *Rana zweifeli* y *Rana forreri*. Es de destacarse que estos organismos fueron colectados durante la misma temporada.



La piel fue la zona en donde se presentó una mayor diversidad de bacterias, ya que por las características de la permeabilidad de su piel es más susceptible a contraer agentes del hábitat en el que se encuentran. Sin embargo, ningún organismo colectado presentó alguna alteración física que indicara que la presencia de estas bacterias fuera dañina para ellos.

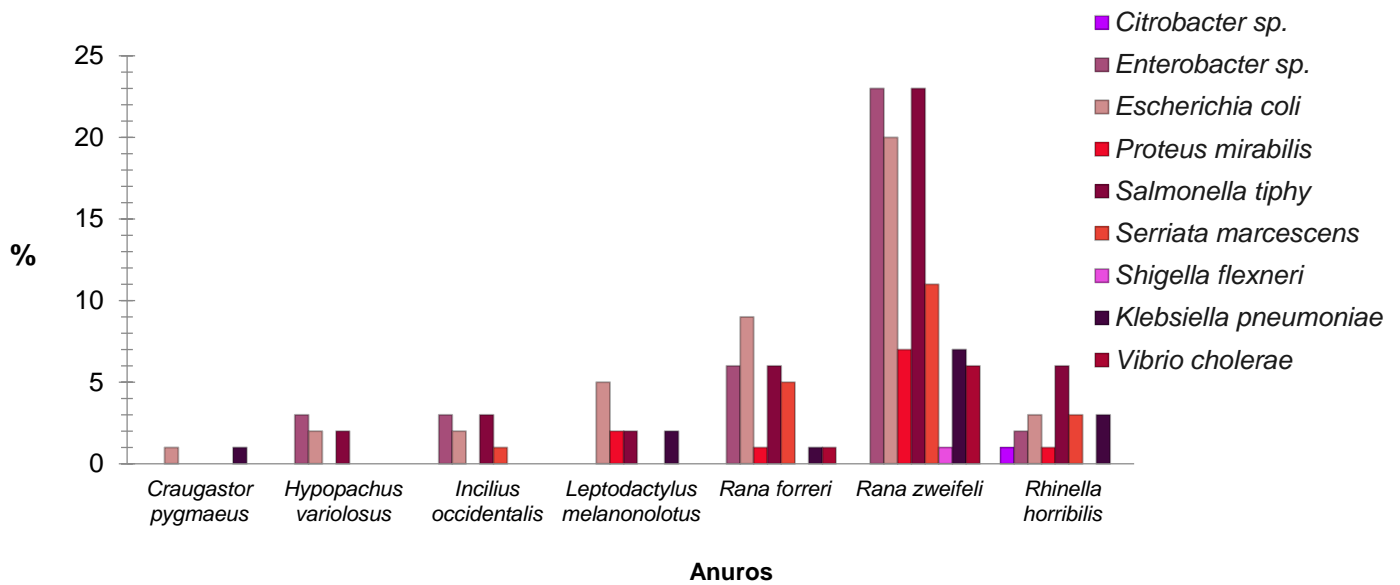


Figura 12. Bacterias diferenciadas por organismo colectado.



Tabla 2. Especies bacterianas diferenciadas por boca, cloaca y piel de los Anuros.

Anuros	Boca	Cloaca	Piel
<i>Craugastor pygmaeus</i>			<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Escherichia coli</i> .
<i>Hypopachus variolosus</i>	<i>Enterobacter</i> sp., <i>Salmonella tiphy</i>	<i>Enterobacter</i> sp., <i>Escherichia coli</i> .	<i>Enterobacter</i> sp., <i>Salmonella tiphy</i> .
<i>Incilius occidentalis</i>	<i>Enterobacter</i> sp., <i>Serriata marscensens</i> , <i>Salmonella tiphy</i>	<i>Enterobacter</i> sp., <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella tiphy</i>	<i>Enterobacter</i> sp., <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella tiphy</i>
<i>Leptodactylus melanonolotus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella tiphy</i>	<i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella tiphy</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Proteus mirabilis</i>
<i>Rana forreri</i>	<i>Escherichia coli</i> , <i>Enterobacter</i> sp., <i>Salmonella tiphy</i> , <i>Serriata marscens</i> <i>Vibrio cholerae</i>	<i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Salmonella tiphy</i> , <i>Serriata marscens</i> <i>Enterobacter</i> sp. <i>Vibrio cholerae</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Salmonella tiphy</i> <i>Serriata marscens</i> <i>Enterobacter</i> sp. <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Vibrio cholerae</i>
<i>Rana zweifeli</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Enterobacter</i> sp. <i>Serriata marscens</i> <i>Salmonella tiphy</i> <i>Vibrio cholerae</i>	<i>Salmonella tiphy</i> <i>Serriata marscens</i> <i>Enterobacter</i> sp. <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Vibrio cholerae</i> <i>Escherichia coli</i>	<i>Enterobacter</i> sp. <i>Salmonella tiphy</i> <i>Serriata marscens</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Vibrio cholerae</i>
<i>Rhinella horribilis</i>	<i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella tiphy</i> , <i>Enterobacter</i> sp., <i>Serriata marscens</i>	<i>Citrobacter</i> sp, <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Salmonella tiphy</i> <i>Serriata marscens</i> , <i>Proteus mirabilis</i>	<i>Enterobacter</i> sp., <i>Salmonella tiphy</i> , <i>Serriata marscens</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> .



7.3 Análisis de Temperatura y pH asociados al microhábitat de los Anuros del parque.

Se tomaron mediciones de Temperatura y pH en cuatro charcas diferentes en las cuales se encontraron mayor presencia de anuros, durante los tres muestreos realizados para este trabajo. En la Tabla 3 se muestran los datos de pH y temperatura con su promedio. La temperatura en general en las cuatro charcas se mantiene en $15^{\circ}+3^{\circ}\text{C}$, sin embargo, en la charca 4 se encuentra ligeramente por debajo de las otras charcas con un promedio de 15.1°C . El pH mostro un valor de 7 en todos los muestreos, lo cual se considera un pH neutro por lo que se considera que no muestra ninguna alteración.

Tabla 3. Relación promedio de pH y temperatura de las charcas en donde se colectaron los organismos.

Charca	pH	Temperatura \bar{x}
1	7	15.6 °C
2	7	15.9 °C
3	7	15.9 °C
4	7	15.1 °C



7.4 Análisis bacteriológicos de la calidad del agua de los diferentes puntos del parque.

En la Tabla 4 se muestran los datos del NMP (Número más Probable) de coliformes totales por 100 ml de agua. En las charcas 1 y 2 no se obtuvieron valores positivos, respecto a la charca 3 se obtuvo un valor de <2 NMP/100 ml. pero presenta mayor valor en el punto 4 con 2 NMP/100 ml. ya que resultaron 2 diluciones positivas. Sin embargo, estos valores son bajos, lo que quiere decir que el arroyo en el que se realizaron los muestreos no presenta un mayor grado de contaminación por coliformes. De acuerdo con la NOM-001-SEMARNAT-1996 los límites se encuentran entre 1,000 y 2,000 por lo que los valores obtenidos en el muestreo en campo son bastante bajos a los límites permitidos, esto indica que los cuerpos de agua que se encuentran dentro del parque no presentan perturbación por coliformes fecales y como se muestra en la Tabla 5 solo las charcas 3 y 4 presentaron presencia de coliformes por lo que no muestra una presencia de contaminación.

Tabla 4. Coliformes totales por NMP con 95% del límite de confianza.

Zona	Charca 1	Charca 2	Charca 3	Charca 4
NMP/ 100 mL	<2	<2	2	2

Tabla 5. Presencia de coliformes de estanque muestreado.

Charca	Temperatura	pH	Presencia de coliformes
1	15.6°C	7	NEGATIVO
2	15.9 °C	7	NEGATIVO
3	15.9°C	7	POSITIVO
4	15.1°C	7	POSITIVO



7.5 Análisis de Varianza y prueba Holm- Sidak.

De acuerdo al Análisis de Varianza se observaron diferencias significativas entre las bacterias encontradas con relación a las especies y la zona de frotis ($P < 0.001$). Por otra parte la prueba de Holm- Sidak nos indicó que existen diferencias entre las bacterias encontradas en la zona de frotis sobre todo en *Rana forreri*, *Leptodactylus melanonotus*, *Hypopachus variolosus*, *Incilius occidentalis* y *Rana zweifeli* con respecto a las demás especies ($P < 0.001$).



Tabla 6. Prueba de Holm-Sidak. Comparación múltiple entre las bacterias de acuerdo a la presencia en cada zona de frotis y a la especie.

Zona de frotis	Comparación	Significancia (P)
Cloaca	<i>Rana forreri</i> vs. <i>Rana zweifeli</i> <i>Hypopachus variolosus</i> vs. <i>Rana forreri</i> <i>Rhinella horribilis</i> vs. <i>Rana forreri</i> <i>Craugastor pygmaeus</i> vs. <i>Rana forreri</i> <i>Leptodactylus melanonolotus</i> vs. <i>Rhinella horribilis</i> <i>Leptodactylus melanonolotus</i> vs. <i>Craugastor pygmaeus</i> <i>Leptodactylus melanonolotus</i> vs. <i>Rana zweifeli</i> <i>Leptodactylus melanonolotus</i> vs. <i>Incilius occidentalis</i> <i>Leptodactylus melanonolotus</i> vs. <i>Hypopachus variolosus</i>	P <0.001
Boca	<i>Hypopachus variolosus</i> vs. <i>Rana zweifeli</i> <i>Hypopachus variolosus</i> vs. <i>Rhinella horribilis</i> <i>Hypopachus variolosus</i> vs. <i>Craugastor pygmaeus</i> <i>Hypopachus variolosus</i> vs. <i>Rana forreri</i> <i>Hypopachus variolosus</i> vs. <i>Leptodactylus melanonolotus</i> <i>Incilius occidentalis</i> vs. <i>Rana forreri</i> <i>Incilius occidentalis</i> vs. <i>Rhinella horribilis</i> <i>Incilius occidentalis</i> vs. <i>Rana zweifeli</i> <i>Incilius occidentalis</i> vs. <i>Craugastor pygmaeus</i> <i>Incilius occidentalis</i> vs. <i>Leptodactylus melanonolotus</i>	P <0.001
Piel	<i>Rana zweifeli</i> vs. <i>Craugastor pygmaeus</i> <i>Rana zweifeli</i> vs. <i>Rhinella horribilis</i> <i>Incilius occidentalis</i> vs. <i>Hypopachus variolosus</i> <i>Hypopachus variolosus</i> vs. <i>Rana forreri</i> <i>Rhinella horribilis</i> vs. <i>Rana forreri</i> <i>Craugastor pygmaeus</i> vs. <i>Rana forreri</i> <i>Leptodactylus melanonolotus</i> vs. <i>Rhinella horribilis</i> <i>Leptodactylus melanonolotus</i> vs. <i>Craugastor pygmaeus</i> <i>Leptodactylus melanonolotus</i> vs. <i>Hypopachus variolosus</i> <i>Hypopachus variolosus</i> vs. <i>Rana zweifeli</i> <i>Incilius occidentalis</i> vs. <i>Rhinella horribilis</i> <i>Incilius occidentalis</i> vs. <i>Craugastor pygmaeus</i>	P <0.001



8. Discusión

Los cambios antropogénicos en el ambiente han sido de las principales causas para propiciar las enfermedades en anfibios a nivel global, el cambio climático, deforestación y contaminantes en el ambiente pueden tener gran influencia en la inmunidad del organismo, así como la virulencia de patógenos y las interacciones ecológicas (Preuss *et al.*, 2020). El ambiente juega un papel importante en la salud de las poblaciones de los anfibios y la permanencia de ellos depende de un conjunto de factores incluyendo los factores bióticos y los factores abióticos como la calidad del agua (Campbell *et al.*, 2018). El Parque Ecológico Niltze (área de estudio) se encuentra fuera de la urbanización del Municipio de Tonatico, por lo que aún se conserva una gran diversidad de flora y fauna, las actividades humanas que se realizan dentro del Parque permanecen parcialmente alejadas a las zonas de muestreo y de donde se colectaron los anuros, por lo que en esta zonas de muestreo a simple vista no se observó una perturbación directa por actividades humanas.

Los estudios para conocer la microbiota en anfibios son aún escasas e inconsistentes ya que las investigaciones se han enfocado en enfermedades potencialmente letales para ellos, como la quitridiomycosis por *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), por ejemplo Muletz *et al.*, (2012), examinaron el uso de bioaumentación para la mitigación de la quitridiomycosis sobre la salamandra *Plethodon cinereus*, determinando el efecto anti *Bd* por medio de la bacteria *Janthinobacterium lividum* la cual fue introducida dentro de suelo y por medio del ambiente se transmitía a su piel y así podía reducir el riesgo de infección por este hongo. Al igual que Familiar *et al.*, (2017), que documentaron la infección por *B. dendrobatidis* en poblaciones de la rana *Phyllorhina loveridgei* para determinar si la infección estaba correlacionada con cambios en las comunidades microbiales de la piel. Mientras que Becker *et al.*, (2019), analizaron si los microbiomas cutáneos podían tener un rol importante en las defensas ante la quitridiomycosis.



A consecuencia de la falta de información documentada, en el presente trabajo se evaluaron factores como la microbiota bacteriana de los Anuros y los factores abióticos como la temperatura, pH y coliformes totales para evaluar la calidad de agua en donde se encontraban estos organismos. Courtney et al., (2007), señala que muchas de las bacterias encontradas en los anuros son bacterias Gram-negativas que residen en el suelo y o en el agua y comúnmente encontradas en el ambiente. En el presente trabajo se encontró que en la mayor parte de los anuros analizados hubo una presencia abundante de *Enterobacter* sp. y en algunos organismos se tuvo registro de *Klebsiella pneumoniae*, las cuales son bacterias Gram-Negativas. Se sabe que los anuros pueden tener una microbiota natural sin tener asociaciones a alguna enfermedad como lo reporta Aguillón et al., (2007), sobre todo bacterias en la cavidad cloacal de anfibios y las más comunes son *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter koseri*, *C. freundii*, *Serratia marcescens*, *Salmonella* spp y *Proteus*. En los anuros colectados dentro del Parque se tiene registrado que *Citrobacter* sp. se presentó en la zona cloacal de una especie, *Enterobacter* sp. se presentó en la mayoría de los organismos en la zona cloacal, *Serratia marcescens* y *Proteus mirabilis* se presentaron en menor cantidad en la zona cloacal y *Salmonella tiphya* tuvo una presencia significativa en la zona cloacal de las especies. *Escherichia coli* y *Proteus spp.* son especies que se encuentran involucradas en la microbiota intestinal de humanos y que en consecuencia se presentan en aguas residuales, lo que causa zoonosis con cuadros de infecciones ulcerosas propiciando descamación y afecciones respiratorias en anfibios. *Serratia marcescens*, se ha encontrado en el suelo, agua, plantas y animales y principalmente en ambientes pobres de nutrientes como agua potable, cañerías y llaves (Jifkins, 2017, Del- Pozo et. al. 2011, Dossi et. al.. 2002), pero como lo menciona Garnica (2017) diversos factores influyen en la respuesta del sistema inmune por cambios elevados de temperatura que favorezcan a la proliferación de bacterias.



No toda la microbiota bacteriana presente en estos organismos es perjudicial para ellos ya que como lo confirma Varga *et al* (2019), que nos dice que la piel es una interface entre el organismo interno y el ambiente externo la cual está expuesta a factores ambientales incluyendo a los patógenos, de esta manera es así como la piel de los anfibios en primera instancia actúa como un órgano inmunológico. Hacıoglu (2013) señala que el origen de muchas bacterias patógenas nace de descargas de las aguas residuales *Vibrio sp.*, *Citrobacter sp.*, *Enterobacter sp.*, *E. coli*, *Klebsiella sp.* las cuales se han encontrado principalmente en la cavidad oral y cloacal de los anfibios; en contraste con el presente trabajo únicamente en un organismo (*Rhinella horribilis*) se observó presencia de *Citrobacter sp.* dado a la poca presencia de esta bacteria es probable que no exista alguna amenaza de este patógeno, además de que el organismo no presentó alteración a simple vista como para asegurar que sea una bacteria oportunista que afecte al organismo.

En otro estudio realizado por Brunetti *et al* (2018), en donde analizan las bacterias simbióticas de la piel de las ranas, reportan que se encontraron del orden de Enterobacteriales como *Klebsiella* y *Pseudomonas*. Entre las bacterias reportadas en el trabajo tenemos que del género *Klebsiella* algunos organismos presentaron esta bacteria y cabe destacar que no se presentó completamente en todas las zonas de frotis (boca, cloaca y piel). La mayor presencia de este género fue en la piel al igual que en el estudio antes mencionado.

Klaphake *et al.*, (2009), en una revisión bibliográfica sobre las enfermedades en anfibios por bacterias y parásitos, mencionan que los anfibios pueden portar patógenos como *Salmonella sp.* Además mencionan que ellos son continuos portadores de esta bacteria. Los resultados del presente trabajo coinciden en la presencia de *Salmonella tiphy* encontrándose mayoritariamente en la piel, posteriormente en la cloaca y en menor porcentaje en la boca, esto puede estar relacionado a que la piel y la cloaca son áreas que se encuentran mayormente en contacto con el ambiente. Sharifian *et. al.*, (2014) menciona que los anfibios de climas templados con bajas preferencias térmicas no son reservorios de *Salmonella*. Sin embargo, de los siete anuros analizados seis contaron con la presencia de



Salmonella typhi dado que el municipio de Tonatico donde se encuentra el Parque Ecológico Niltze presenta clima cálido en la mayor parte del año lo que puede promover a la presencia de esta bacteria.

En la prueba de Holm Sidak se mostraron diferencias significativas entre las bacterias encontradas, con respecto a la zona de frotis y la especie en la que se encuentran. La relación encontrada entre la presencia de bacterias y los organismos colectados puede presentar alguna alteración en ellos cuando excede los niveles normales. Como lo describe Barragán *et al.* (2002), las patologías gastroentéricas en anfibios son producidas por bacterias como *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Citrobacter* spp., las cuales fueron identificadas en el presente trabajo, al igual que *E. coli* y *Proteus* spp. las cuales también estuvieron presentes y producen enfermedades en el Sistema Digestivo y Respiratorio, como estomatitis infecciosa (gingivitis) y neumonía producida por estrés y cambios en la temperatura (Barragán *et al.*, 2002). Según Barrera *et al.* (2013), mencionan que *E. coli* es un componente natural y esencial de la microbiota intestinal en humanos y animales, la mayoría de las cepas de *E. coli* no son patógenas, algunos serotipos tienen un rol importante dentro de las enfermedades intestinales y no intestinales y *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus* y *Serriata* también lo son y es probable el encontrarlas en el agua y suelo. Al igual que *Vibrio* sp. es común encontrarla en los cuerpos de agua, sobre todo si existe una sobrecarga de materia orgánica (Monroy, 2013). Niederle *et al.*, (2019), observó que la primer línea de defensa ante los patógenos es la piel, en donde dos mecanismos de protección clave operan, los cuales son la microbiota asociada con las estructuras cutáneas que son células epiteliales y mucosa y los péptidos producidos por las glándulas glandulares y secretadas por la piel, por lo que señala que la microbiota natural de la “rana toro” *Lithobates catesbeianus* incluye a la familia Enterobacteriaceae como *Citrobacter freundii*, *Enterobacter* spp. *Escherichia coli*, *E. blattae*, *Klebsiella* spp. y *Proteus vulgaris*, correspondientes a bacterias Gram-negativas. En relación con nuestro trabajo todas las bacterias analizadas fueron Gram-negativas y de la familia Enterobacteriaceae. Sin embargo, si existe un cambio drástico a consecuencia de



contaminación las bacterias presentes en los organismos pueden llegar a ser detonantes de enfermedades patógenas.

La estructura del microbioma del organismo está fuertemente influenciada por los factores ambientales y a su vez los organismos pueden portar diferentes comunidades bacterianas debido al microambiente en donde se encuentran y las que están asociadas al organismo pueden influir en la salud de ellos, inhibir o vencer a los patógenos al mismo tiempo, ya que las infecciones pueden provocar desequilibrios en el microbioma en donde se localizan (Becker *et al.*, 2019). Por lo tanto, es importante no solo conocer la microbiota bacteriana que tienen organismos si no también conocer la calidad del ambiente en el que se encuentran ya que como lo reporta Campell *et al.*, (2018), las características del hábitat en donde se encuentran pueden afectar en las enfermedades de los organismos, por ejemplo el calentamiento global puede afectar a los brotes de *Bd*, es decir la buena calidad del hábitat es una opción potencial para moderar a los patógenos que se encuentran en el ambiente. En este trabajo se tomaron en consideración aspectos abióticos para evaluar la buena calidad del ambiente y así mismo estimar el grado de perturbación en el ambiente y qué tanto afecta a los organismos que como se conoce juegan un papel importante como bioindicadores.

Respecto a la calidad del agua se analizaron cuatro charcas en donde se encontraron los organismos muestreados mediante el protocolo de Robles *et al.* 2013 que determina características físicas, químicas y bacteriológicas. Las charcas presentaron un pH de 7 y una temperatura máxima de 15.9°C y la mínima de 15.1°C. Los niveles temperatura y el pH se encuentran relacionados debido a que si existe un aumento de temperatura, el pH de igual forma tiende a aumentar provocando una disminución de oxígeno (Reitter, 2021) al igual que la estructura microbiológica de los cuerpos de agua. Mendoza *et al.*, (2015), mencionan que el rango óptimo para el crecimiento de bacterias se encuentra entre los 22°C y 33°C, por lo que en comparación con nuestros valores obtenidos en campo se obtuvo una temperatura de 15°C en todas las charcas de agua, lo que se considera que se encuentra en un rango bajo al reportado para el crecimiento óptimo de bacterias.



En valores de pH, Rodríguez (2009), menciona que el rango de pH, puede variar entre 4.5 y 8.5 en aguas naturales o artificiales para considerarse de buena calidad. Sin embargo, en nuestro trabajo el resultado en todas las charcas fue de 7 por lo que tampoco sobrepasa el antecedente mencionado. En este estudio se consideraron las coliformes presente en las charcas por el NMP, las coliformes son capaces de sobrevivir en el medio acuático en condiciones ideales y su presencia en el agua se considera como un índice de contaminación fecal y de organismos patógenos, al igual que su presencia se puede considerar como contaminación reciente, ya que la prevalencia de las bacterias en el medio acuático es más baja. Se sabe que las coliformes fecales son termotolerantes por lo que soportan temperaturas elevadas (Arcos *et al.*, 2005; Barrera *et al.*, 2013; Robles *et al.*, 2013). Por lo que en contraste con el presente trabajo se obtuvieron valores bajos para la presencia de coliformes, únicamente dos charcas presentaron valores positivos al análisis, sin embargo, se obtuvo un rango bajo (2 por NMP con un límite de confianza del 95%) de acuerdo con los límites establecido por la NOM-001-SEMARNAT-1996. Esto puede deberse a la baja temperatura que se reportó en las charcas y así como lo reporta Garnica (2017), indicando que las coliformes totales no suelen sobrevivir al medio acuático debido al estrés en que se someten y su mortalidad es dependiente de las poblaciones con otras bacterias al igual que los efectos de la luz solar y la temperatura del agua, así mismo por encima de los 15°C es menos probable la sobrevivencia de éstas. Con todo esto, se podría considerar que en el Parque Ecológico Niltze no se ha generado un impacto ambiental fuerte que altere a los factores abióticos.

De acuerdo a lo observado y a los resultados obtenidos en campo y procesados en el laboratorio, se concluye que el Parque Ecológico Niltze cuenta con una calidad ambiental favorable para la permanencia y el desarrollo de seres vivos, los anuros analizados presentaron microbiota bacteriana similar a la documentada por otros estudios lo que nos representa que se trata a microbiota bacteria propia de este grupo de animales. Del mismo modo, los parámetros fisicoquímicos evaluados como pH, Temperatura y Coliformes totales no presentaron rangos fuera de los



establecidos lo que no provocó que las condiciones del hábitat se modificaran para el crecimiento de bacterias que afectaran en gran medida al hábitat y en consecuencia a los anuros que habitan en él, dado que la susceptibilidad de ellos al contraer patógenos que se encuentran en el ambiente es muy alta debido a las características mencionadas en su piel. Los resultados que se obtuvieron con un rango levemente fuera de lo establecido puede deberse a que son puntos más cercanos a la zona de acampar en donde se ve más la presencia de las actividades humanas. Así mismo, se considera que se deben continuar realizando evaluaciones más detalladas para descartar o tomar medidas de mitigación para continuar con la conservación y buena calidad del ambiente del Parque Ecológico Niltze.



9. Conclusiones

- Se colectaron un total de 22 organismos de 7 especies diferentes del Orden Anura dentro del Parque Ecologico Niltze, los cuales fueron: *Craugastor pygmaeus*, *Hypopachus variolosus*, *Incilius occidentalis*, *Leptodactylus melanonotus*, *Rana forreri*, *Rana zweifeli* y *Rhinella horribilis*.
- Se registraron 9 especies diferentes de bacterias las cuales fueron: *Citrobacter sp.*, *Enterobacter sp.*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella tiphy*, *Serriata marcenscens*, *Shigella flexneri*, *Klebsiella pneumoniae* y *Vibrio cholerae*, todas bacterias Gram- negativas presentes en boca, cloaca y piel de los Anuros.
- Las especies bacterianas con mayor presencia fueron *Enterobacter spp* y *Escherichia coli* y *Salmonella tiphy*. *Citrobacter sp.* se encontró únicamente en un organismo.
- La piel fue la zona en donde se obtuvo una mayor presencia de bacterias, debido a la permeabilidad de su piel.
- Debido a que los organismos no se encontraron con alguna anomalía física y de acuerdo a estudios realizados, la microbiota bacteriana de los Anuros analizados es perteneciente a su microbiota natural.
- La temperatura se mantiene en 15°C, en todas las charcas. El pH mostró un valor de 7, lo que es pH neutro lo que no muestra rangos fuera de lo establecido.



- Los valores obtenidos de Temperatura y pH no son favorables para el crecimiento de bacterias en medios acuáticos de acuerdo a lo reportado por algunos autores.
- No se obtuvieron valores de coliformes fecales fuera de lo establecido por las normas mexicanas.
- El Parque Ecológico Niltze cuenta con una calidad ambiental favorable, ya que no existe una perturbación en los organismos analizados. Sin embargo los resultados que se obtuvieron con un rango levemente fuera de lo establecido pueden deberse a que son puntos más cercanos a la zona de acampar en donde se ve más la presencia de las actividades humanas
- Para finalizar, Los parámetros evaluados como la microbiota y los factores abióticos (Temperatura y pH) se encuentran fuera de los parámetros establecidos para un desarrollo óptimo de patógenos, por lo que se considera que el Parque sigue manteniendo una buena calidad para los organismos, sin embargo, se debe seguir analizando otros factores para seguir manteniendo el Parque en condiciones óptimas para los seres vivos.



10. Bibliografía

- Aguilón G, Lazcano VD, Ramírez RR, Aguirre RA, Zárate RJ, Wong GA. 2007. Bacterias cloacales y evaluación física de la herpetofauna del Parque Ecológico Chipinique. *Ciencia UANL*. Vol.X No. 2. 168-174pp
- Arcos MP, Ávila de Navia SL, Estupiñán SM, Gómez AC, 2005. Indicadores microbiológicos de contaminación de las fuentes de agua. *Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca*. 3(004). 69-79pp.
- Barragán F, Bibiana K, 2002. Enfermedades de Anfibios y Reptiles. *Universidad Nacional de Colombia*. 32(2).
- Barrera-Escorcia G., Fernández-Rendón CL, Wong-Chang I, Ramírez-Romero P. 2013. La sensibilidad del grupo coliforme como indicador de la presencia de enterobacterias patógenas en cuatro cuerpos acuáticos de México. *Hidrobiologica*. 23(1). 87-96.
- Becker CG, Bletz MC, Greenspan SE, Rodríguez D, Lambertini C, Jenkinson TS, Guimaraes J, Assis AP, Geffers R, Jarek M, Toledo LF, Vences M, Haddad C. 2019. Low-load pathogen spillover predicts shifts in skin microbiome and survival of a terrestrial-breeding amphibian. *Proc R. Soc.B*. 286.
- Becker CG, Rodríguez D., Longo AV., Toledo LF, Lambertini C., Leite DS, Zamudio K R. 2016. Deforestation, host community structure, and amphibian disease risk. *Basic and Applied Ecology*, 17(1), 72-80.
- BD,2014,BD MacConkey II Agar. Recuperado 19 de agosto del 2020. <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8770>
- Bosch J, 2003, Nuevas Amenazas para los anfibios: enfermedades emergentes. *Munibe*,16,56-73
- Britania, 2015 E.M.B Agar . Recuperado el 19 de agosto del 2020.
- Brunetti EA, Lyra LM, Melo GW, Andrade EL, Palacios-Rodríguez P, Prado MB, Haddad FC, Pupo TM, Lopes PN. 2018. Symbiotic skin bacteria as a source for sex-specific scents in frogs. *PNAS*



- Calderon M., Almeida C., González P., Jofré M. 2019. Influence of water quality and hábitat conditions on amphibian community metrics in rivers affected by urban activity. *Urban Ecosystems*. 22(743). 743-755.
- Camacho A, Giles M, Ortegón A, Palao M, Serrano Bm Velázquez O, 2009. Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos 2da edición, *Facultad de Química. UNAM*.
- Campbell E, Adams M, Fisher R, Grear D, Halstead B, Hossack B, Muths E, Richgels K, Rusell R, Smalling K, Waddle J, Walls S, White C. 2018. Identifying management relevant research priorities for responding to disease-associated amphibian declines. *Global Ecology and Conservation*. 16
- Chaparro-Herrera, D. J., Nandini, S., & Sarma, S. S. S. 2020. Turbidity effects on feeding by larvae of the endemic *Ambystoma mexicanum* and the introduced *Oreochromis niloticus* in Lake Xochimilco, Mexico. *Ecohydrology & Hydrobiology*. 20(1). 91-101.
- CONAGUA. 2020. Actualización de la Disponibilidad de Aguas en el Acuífero Tenancingo (1504), Estado de México. Recuperado 13 de Marzo de 2021. https://sigagis.conagua.gob.mx/gas1/Edos_Acuiferos_18/edomex/DR_1504.pdf
- Courtney E, Joseph C, Falkinham O, Belden L. 2007. Identification of the natural bacterial microflora on the skin of Eastern newts Bullfrog tadpoles and redback salamanders. *Herpetologica*. 63(1). 66-71.y
- Del- Pozo J., Girling S., Pizzi R., Mancinelli E., Else W., 2011. Severe Necrotizing Myocarditis caused by *Serriata marcescens* Infection in an Axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Journal of comparative pathology*. 144, 4: 334-338.
- Densmore- Christine L., Green- David E., (2007). Diseases of Amphibians. *ILAR Journal*. 48 (3). 235-254.
- Dossi M., Escalona M., Serrano C., Silva M., Juliet C., Fernández A., Leiva V., Fernández J., 2002. *Serriata marcescens*: Descripción de un brote de infección intrahospitalaria. *Rev Chil Infect*. 19(4). 262-266.



- Douglas C., Molly B., Jordan K., Valerie M., 2016. Managing Amphibian Disease with Skin Microbiota. *Trends in Microbiology*, 24(3), 161-164
- Familiar LM, Rebollar AE, Harris NR, Vredenburg TV., Hero MJ. 2017. Temporal variation of the skin bacterial community and *Batrachochytrium dendrobatidis* Infection in the Terrestrial Cryptic Frog *Phyllorhina loveridgei*. *Front. Microbiol.* 8:2535.
- Garnica F. 2017. Relación de bacterias Aerobias en *Crocodylus moreletti* (Archosauria:Crocodylidae) y el medio donde habita en la laguna La Colorada, Cocodrilaro Tecomán, Colima. Tesis para obtener el título de Biólogo. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala.
- Gobierno del Estado de México. s/a. Secretaria de Seguridad Publica. Recuperado el 17 de agosto del 2020. <https://sseguridad.edomex.gob.mx/ixtapan>
- Goh- Shin G., Saeidi- Nazanin, Gu- Xiaoqiong, Vergara- Genevieve R., Lian- Liang, Fang- Haoming, Kitajima-Masaki, Kushmaro- Ariel, Gin- Karina Y. 2019. Occurrence of microbial indicators, pathogenic bacteria and viruses in tropical surface Waters subject to contrasting land use. *Water Research.* (150). 200-215.
- González J., 2014. Bioindicadores como aliados en el monitoreo de condiciones ambientales. *Éxito Empresarial.* (254).
- Gonzalez-Pedroza L., 2017. Estudio de Ecoturismo en el Parque del Sol, Tonalico (México) 2015, Tesis para obtener el grado de Maestra en Estudios Sustentables Regionales y Metropolitanos. Universidad Autónoma del Estado de México.
- Hacıoglu N., Tosunoglu M., 2013. Determination of antimicrobial and heavy metal resistance profiles of some bacteria isolated from aquatic amphibian and reptile species. 407-413.
- H. Ayuntamiento Municipal, 2013, Plan de desarrollo Municipal. Recuperado el 10 de agosto de 2019, de <http://www.tonalico.gob.mx/publicaciones/pdm.pdf>



- INEGI, 2009, Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Recuperado el 10 de Agosto de 2019, de <http://inegi.org.mx>
- Jalal K., Noor H., Azrul M., Akbar J., Kamaruzzaman B. 2012. Studies on water quality and pathogenic bacteria in coastal water Langkawi, Malaysia. *Journal Environmental Biology*. 33. 831-835.
- Jifkins J. 2017. Interacción biológica de *Ambystoma mexicanum* con las bacterias patógenas presentes en su hábitat. Tesis para obtener el grado de Biólogo. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala.
- Klaphake E. 2009. Bacterial and Parasitic Diseases of Amphibians. *Vet. Clin Exot Anim*. 12. 597-608.
- Lambert M. 1977. Environmental Effects of Heavy Spillage from a Destroyed Pesticide Store near Hargeisa (Somaliland) Assessed During the Dry Season, Using Reptiles and Amphibians as Bioindicators. *Archives Environmental Contamination Toxicology*. (32). 80-93.
- Larrea-Murrel J., Rojas-Badía M., Romeu-Álvarez, Rojas-Hernández N., Heydrich-Pérez M., 2013., Bacterias indicadoras de contaminación fecal en la evaluación de la calidad de las aguas: revisión de la literatura. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. 44(3).
- Leyte-Manrique A., Gonzalez-García R., Quintero-Díaz G., Alejo-Iturvide F., Berriozabal-Islas C. 2018. Aspecto ecológico de una comunidad de anuros en un ambiente tropical estacional en Guanajuato, México. *Acta zoológica mexicana*.(34).
- Martinez T. 2015. Caracterización hidrogeoquímica del sistema de manantiales termales de Ixtapan de la Sal Tonicato, Estado de México. Tesis para obtener el grado de Maestra en Ciencias del Agua. Universidad Autónoma del Estado de México. Facultad de Ingeniería.
- Mendoza R, Silva R. Jiménez A, Rodríguez K, Sol A, 2015. Lake Zirahurn, Michoacan, Mexico: An approach to sustainable water resource management based on the chemical and bacterial assessment of its water body. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*. 2: 1-11



- Monroy-Dosta MC, De Lara-Andrade R, Castro-Mejía J, Castro-Mejía G., Coelho-Emerenciano. 2013. Composición y abundancia de comunidades microbianas asociadas al biofloc en un cultivo de tilapia. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. 48(3). 511-520pp.
- Muletz, RC, Myers MJ, Domangue JR, Herrick BJ, Harris NR. 2012. Soil bioaugmentation with amphibian cutaneous bacteria protects amphibian hosts from infection by *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Biological Conservation*. 152. 119-126pp.
- Niederle MV, Bosch J, Ale CE, Nader-Macías ME, Aristimuño Ficooseco C, Toledo LF, Valenzuela-Sánchez A, Soto-Azat C, Pasteris SE. 2019. Skin-associated lactic acid bacteria from North American bullfrogs as potential control agents of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *PLoS ONE*. 14(9).
- Parra- Olea G., Flores-Villela O., Mendoza-Almeralla C. 2014. Biodiversidad de anfibios en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*.(85)
- Preuss-Jackson F., Greenspan- Sasha E., Rossi- Eliandra M., Lucas Gonsales- E., Neely-Wesley J., Valiati- Victor H., Woodhams- Douglas C., Becker-C., Tozzetti- Alexandro M. 2020. Widespread Pig Farming Practice Linked to Shifts in Skin Microbiomes and Disease in Pond- Breeding Amphibians. *Environmental Science & Technology*.54 (18) 11301-11312
- Ramírez O. 2019. Estudio de la Herpetofauna del Municipio de Huichapan, Hidalgo. Tesis para obtener el título de biólogo. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala.
- Reitter C, Petzoldt H., Schwab F, Stange C, Hamsch B., Tiehm A., Lagkourdos I, Gescher J, Hügler M. 2021. Seasonal dynamics in the number and composition of coliform bacteria in drinking water reservoirs. *Science of the Total Environment*. 787
- Robles ES, Ramírez E, Durán A, Martínez ME, González ME. 2013. Calidad bacteriológica y fisicoquímica del agua del acuífero Tepalcingo- Axochiapan, Morelos, México. *Avances en Ciencia e Ingeniería*. 4(1).1
- Rodríguez Zamora J. 2009. Parámetros, fisicoquímicos de dureza total en calcio y magnesio, pH, conductividad y temperatura del agua potables



analizados en conjunto con las Asociaciones Administradoras del Acueducto (ASADAS), de cada distrito de Grecia, cantón de Alajuela, noviembre del 2008. *Revista Pensamiento Actual*. 9(12-13). 125-134pp

- Rohr- Jason, Raffael- Thomas, Romansic- John, MacCallum- Hamish, Hudson- Peter., 2008, Evaluating the links between climate, disease spread and amphibian declines. *PNAS*. 105 (44). 19-28pp.
- Rollins-Smith L. 2017, Amphibian immunity-stress, disease, and climate change. *Developmental and Comparative Immunology*, 66, 111-119.
- Rojas-Hucks S., Arno- Gutleb C., M- González C., Contal- Servane, Mehennaoui, Jacobs-An, Hilda-Witters E., José-Pulgar. 2019. *Xenopus laevis* as a Bioindicator of Endocrine Disruptors in the Region of Central Chile. *Archiv Environmental Contamination and Toxicology*. 77. 390-418.
- Santos-Barrera G. 2004. Enfermedades infecciosas y su papel en la declinación mundial de las poblaciones de anfibios. CONABIO. *Biodiversitas*. (56), 1-6pp.
- Sharifian F., Mojdeh, Pasmans, Frank, Martel, 2014, Migrating Common Toads (*Bufo bufo*) in Rural Temperate Regions: Reservoirs of Salmonella?, *Journal of Wildlife diseases*, 50(2),326-329 ‘
- Trevor-Beebee J., Richard-Griffiths A, (2005). The amphibian decline crisis: A watershed for conservation biology, *Biological Conservation*, 125(3), 271-285pp.
- Val-Richard B., 2019. Direct and Indirect Effects of Environmental Contaminants on Amphibians. *Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences*, Elsevier.
- Varga J, Bui-Marinos M, Katzenback B, 2019. Frog Skin Innate Immune Defences: Sensing and Surviving Pathogens. *Front Immunol*.9:3126.



ANEXO I

Método de preparación y especificaciones de Medio de Transporte y Medios de cultivo.

Medio de Transporte AMIES

Suspender 20g en un litro de agua destilada, mezclar bien y disolver con calor y agitación frecuentemente, Posteriormente hervir hasta su completa disolución, distribuir en tubos con rosca, finalmente esterilizar en autoclave a 120° por 15 minutos y dejar enfriar.

Agar Dextrosa y Papa

Suspender 39 g en un litro de agua destilada, calentar hasta su punto de ebullición agitando frecuentemente. Posteriormente, esterilizar en autoclave a 120° por 15 minutos, finalmente vaciar en cajas Petri esterilizadas.

Agar Mac Conkey

Suspender 50 g en un litro de agua destilada, calentar hasta su punto de ebullición agitando frecuentemente. Posteriormente, esterilizar en autoclave a 120° por 15 minutos y finalmente vaciar en cajas Petri esterilizadas.

Agar Eosina y Azul de Metileno

Suspender 36 g en un litro de agua destilada, agitar y calentar hasta llegar a su ebullición, esterilizar en autoclave a 120° por 15 minutos y vaciar en caja Petri estéril.

Agar TCBS

Suspender 36g en un litro de agua destilada, agitar frecuentemente y calentar hasta su ebullición, esterilizar en autoclave a 120° por 15 minutos y vaciar en cajas Petri estériles.



Agar de Dextrosa y Papa

La infusión de papa como fuente de almidón y dextrosa son la base para el crecimiento de hongos y levaduras, su bajo pH evita el crecimiento de bacterias y los organismos que se pueden desarrollar a partir de una muestra de agua son *Saccharomyces cereviseae* y *P. aeruginosa* (Jifkins, 2017).

Agar Mac Conkey

Las peptonas y el cristal violeta proporcionan nutrientes que inhibe el crecimiento de las bacterias gran positivas, especialmente enterococos y estafilococos. La diferenciación de los microorganismos se logra por la combinación de lactosa e indicador de pH rojo neutro, producen colonias incoloras o de color rosas a roja según la capacidad para fermentar carbohidratos (BD, 2014).

Agar Eosina y Azul de Metileno

Es utilizado para el aislamiento de bacilos Gram negativos de rápido desarrollo y pocas exigencias de nutrición, permite el crecimiento de especies de la familia Enterobacteriaceae. Su principal fuente de nutrición es la peptona la cual favorece el desarrollo microbiano (Britania, 2015).

Agar TCBS (Tiosulfato Citrato Sales Biliares de Sacarosa)

Su contenido de peptonas y extracto de levadura proporcionan la fuente necesaria de nutrientes para el desarrollo de microorganismos como *Vibrio cholerae* y *V. parahaemolyticus*. Su contenido inhibe bacterias Gram (+) (Jikfins, 2017).



ANEXO II

Preparación y especificación es de pruebas bioquímicas Citrato de Simmons, LIA, MIO y TSI

Agar TSI

Suspender 59.4g del polvo en 1 litro de agua destilada, mezclar perfectamente y calentar con agitación frecuente, hervir hasta su desilusión total. Distribuir en tubos hasta que ocupe la tercera parte. Posteriormente esterilizar en autoclave a 120° por 15 minutos, enfriar y solidificar el tubo en posición inclinada.

Agar LIA

Suspender 33g del polvo en 1 litro de agua destilada, mezclar perfectamente y calentar con agitación frecuente, hervir hasta su desilusión total. Distribuir en tubos hasta que ocupe la tercera parte. Posteriormente esterilizar en autoclave a 120° por 15 minutos, enfriar y solidificar el tubo en posición inclinada.

Agar Citrato de Simmons

Suspender 24.2g del polvo en 1 litro de agua destilada, mezclar perfectamente y calentar con agitación frecuente, hervir hasta su desilusión total. Distribuir en tubos hasta que ocupe la tercera parte. Posteriormente esterilizar en autoclave a 120° por 15 minutos, enfriar y solidificar el tubo en posición inclinada.

Agar MIO

Suspender 31del polvo en 1 litro de agua destilada, mezclar perfectamente y calentar con agitación frecuente, hervir hasta su desilusión total. Distribuir en tubos hasta que ocupe la tercera parte. Posteriormente esterilizar en autoclave a 120° por 15 minutos, enfriar y solidificar el tubo en posición inclinada.



TSI (Hierro y Triple Azúcar)

Por medio de la fermentación de azúcares, se producen ácido que se presentan por medio de un indicador rojo de fenol el cual cambia a color amarillo en medio ácido. El tiosulfato de sodio tiene una reducción a sulfuro de hidrogeno que reacciona con una sal de negro y proporciona el sulfuro de hierro en color negro (Jifkins, 2014).

LIA (Hierro-Lisina)

La peptona funciona como soporte de crecimiento, el extracto de levadura proporciona las vitaminas necesarias y la dextrosa el carbohidrato fermentable. Los microorganismos que tienen la enzima descarboxilasa, descarboxilan el aminoácido lisina a cadaverina por la alcalinidad el pH se modifica. La desaminación de lisina a ácido alfa cetocarbónico el cual forma compuesto pardo-rojizo en la superficie del medio con la sal de hierro. La formación del ácido sulfhídrico se observa por coloración negra por la producción de sulfuro de hierro (Jifkins, 2014).

Agar Citrato de Simmons

El metabolismo del citrato que realiza con bacterias que tienen citrato permeasa, por medio del ácido tricarbónico. El desdoblamiento del citrato genera oxalacetato y piruvato, el cual da origen a ácidos orgánicos usado como fuente de carbono, producen carbonatos y bicarbonatos alcalinos, por lo tanto, el medio vira al azul y esto indica la producción de citrato permeasa (Britania, 2015).

Agar MIO (Motilidad Indol Ornitina)

Es un medio el cual contiene peptonas las cuales proporcionan fuentes de nitrógeno y carbono. Es exclusivo para diferenciación de *Enterobacterias*, por pruebas de movilidad la cual se presenta por la turbidez difusa alrededor de la línea de inoculación (Jifkins,2014).



ANEXO III

Preparación y especificaciones para Técnica de Número Más Probable para coliformes totales.

Caldo Lactosado

Suspender 13 g en 1 litro de agua purificada. Calentar con agitación a su ebullición para su disolución total. Posteriormente distribuir en tubos con rosca y agregar una campana de Durham. Finalmente esterilizar en autoclave a 120°C por 20 minutos.

Agua de dilución

Disolver 34.0g de Fosfato de Potasio Dihidrogenado en 500ml de agua destilada. Ajustar el pH a 7.2 con Hidróxido de Sodio 1N y diluir a 1L con agua destilada. De esta solución tomar 1.2 ml y ponerlos en 5ml de una solución de Cloruro de Magnesio y aforar a un litro de agua destilada. Finalmente distribuir el agua con 9ml y esterilizar por 15 minutos a 121°C.

Caldo Verde Bilis Brillante 2%

Suspender 40g de polvo en un litro de agua, Disolver y distribuir 10 ml por tubo con ropa y con campana de Durham. Finalmente esterilizar en autoclave por 15 minutos a 120°C

Caldo Lactosado

Es un medio rico en nutrientes el cual no contiene inhibidores para el crecimiento bacteriano. El extracto de carne y peptona que contiene son la fuente de carbono y nitrógeno y la lactosa es el hidrato de carbono fermentable y por la fermentación de la lactosa se produce el ácido y gas el cual se muestra al utilizar las campanas de Durham. (Britania)



Caldo Verde Bilis Brillante 2%

La peptona aporta los nutrientes necesarios para un adecuado desarrollo bacteriano, la bilis y el verde brillante son agentes selectivos que inhiben el desarrollo de bacterias Gram positivas y Gram negativas con excepción de coliformes y la lactosa es el hidrato de carbono fermentable (Britania)

