



Facultad de Medicina



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO FACULTAD DE MEDICINA

**Lo que me rodea, me influye: el papel de los factores abióticos
en el microbioma de la piel de ajolotes pedomórficos obligados**

TESIS

Que para obtener el título de:
Licenciada en Investigación Biomédica Básica

PRESENTA:

Montserrat Marroquín Rodríguez

Directora de tesis:

Dra. Eria Alaide Rebollar Caudillo
Centro de Ciencias Genómicas

Ciudad Universitaria, Ciudad de México, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Agradecimientos

El presente proyecto se realizó bajo la tutoría de la Dra. Eria Alaide Rebollar Caudillo en el laboratorio de microbiología genómica del Centro de Ciencias Genómicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Este trabajo contó con el financiamiento por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través del proyecto CF-2019/373914: “Descifrando el microbioma de la piel en ajolotes y las consecuencias de la interacción huésped-microbioma sobre una enfermedad letal emergente”.

A la Dra Eria, por brindarme las herramientas necesarias para realizar este proyecto, darme la confianza y seguridad que a veces me faltaba y siempre tener una escucha activa a cada idea, duda y comentario.

A los miembros del laboratorio, por toda su retroalimentación y apoyo otorgado durante la realización de este trabajo.

Al Dr. David René Romero Camarena, Dra. Ana Elena Escalante Hernández, Dra. Alba Romero Rodríguez y Dr. Rodolfo García Contreras, por el tiempo dedicado a la lectura de mi tesis y sus valiosos aportes.

A la Lic. Cynthia Lima Cruz, por toda su atención y ayuda brindada a lo largo de mi estancia en la licenciatura, así como por su apoyo en la parte administrativa.

Dedicatoria

A mis papás, por apoyarme en todas y cada una de mis decisiones, pero sobretodo por ayudarme a alcanzar hasta mis sueños más bizarros.

A mi abuelita Tayde, por siempre estar al pendiente de mí, incluso a la distancia, y por procurarme con cada comida y oración.

A mi hermana, mi tía Paty y mis primas Natalia y Ximena, por hacerme reír y brindarme cariño de las formas más inusuales.

A Jimena, por aguantar todas mis quejas, acompañarme en los peores momentos y sacarme las risas más escandalosas desde 2016.

A Gisselle, por iniciarme en el camino de la ciencia, compartirme los aprendizajes que la vida le ha dejado y cuidarme en cada nueva experiencia.

A Viri, Abril y Campi, por enseñarme que la distancia no importa cuando el cariño está siempre presente y ayudarme a confiar en mí cuando más lo necesité.

A Jazmín, por mostrarme que uno siempre puede dar más al mundo de lo que cree y aportarme nuevas maneras de ver la vida.

A Antonio, por haber sido un gran compañero de estudio a lo largo de estos años y siempre motivarme a seguir.

A Orión, por hacer menos solitarias y tristes todas esas tardes del primer año de universidad, sin su compañía no hubiera podido sobrellevarlo.

Resumen	6
Introducción	8
El microbioma de la piel de los anfibios y los factores que influyen sobre su estructura y diversidad	8
El efecto del ambiente en el microbioma de la piel de los anfibios	9
Los ajolotes, unos anfibios muy peculiares	10
Planteamiento del problema	12
Hipótesis	13
Objetivos	13
Sistema de estudio	14
Metodología	18
<u>Parte I.</u>	<u>18</u>
Muestreo del microbioma de la piel	18
Muestreo de datos fisicoquímicos	19
Extracción del DNA, preparación de bibliotecas del 16S y secuenciación de fragmentos del gen 16SrRNA e ITS	19
<u>Parte II.</u>	<u>20</u>
Procesamiento de secuencias y asignación taxonómica de las secuencias 16S e ITS	20
Análisis de diversidad de las comunidades bacterianas y de hongos	21
Obtención de datos climáticos	22
Procesamiento de los datos bioclimáticos	23
Análisis de los factores abióticos	24
Análisis de correlación entre los factores abióticos y las comunidades bacterianas y de hongos	24
Resultados	26
<u>Capítulo 1. Variaciones climáticas y fisicoquímicas presentadas en los sitios de estudio</u>	<u>26</u>
1.1 La precipitación y temperatura de cada sitio ha presentado cambios desde 1990	26
1.2 Cada laguna se distingue en su composición fisicoquímica	34
<u>Capítulo 2. Composición y estructura de la comunidad microbiana de ajolotes pedomórficos obligados</u>	<u>36</u>

2.1 Diversidad alfa y beta	36
2.2 Composición taxonómica de la microbiota	40
Capítulo 3. Influencia del ambiente en la comunidad microbiana	43
Discusión	47
El microbioma de la piel de los ajolotes pedomórficos difiere en su diversidad y estructura de acuerdo con el hábitat	47
La composición del microbioma de la piel de los ajolotes pedomórficos y su relación con el ambiente	49
Las variaciones climáticas y fisicoquímicas dan un carácter específico al microbioma	53
Conclusiones	56
Perspectivas	56
Anexos	58
Referencias	61

Resumen

El declive global de los anfibios observado en los últimos años, ocasionado en parte por la infección de la enfermedad fúngica denominada quitridiomycosis, ha promovido el estudio del microbioma de su piel. Esto debido a que se ha observado que algunos microorganismos que lo conforman son capaces de inhibir el crecimiento de patógenos y proteger al hospedero. No obstante, variaciones en el microbioma ocasionadas por alteraciones en los factores inherentes al hospedero, factores bióticos y abióticos, pueden hacerlo más susceptible a la infección por patógenos. De ahí que en este trabajo se evaluó la relación entre múltiples factores abióticos y el microbioma de cuatro especies de ajolotes del género *Ambystoma*.

Para realizar esto, primero, se determinaron el clima y los parámetros fisicoquímicos del hábitat (lagunas) de las especies *Ambystoma andersoni*, *Ambystoma dumerilii*, *Ambystoma mexicanum* y *Ambystoma taylori*. Luego, se describió la diversidad y composición de las comunidades de bacterias y hongos presentes en su piel para, finalmente, analizar el efecto del clima y los parámetros fisicoquímicos sobre éstas. Para contestar nuestra pregunta se obtuvieron los registros históricos (1970-2017) de precipitación y temperatura de cada locación, se midieron los parámetros fisicoquímicos de cada hábitat y se realizó la secuenciación de 16S e ITS del microbioma de la piel de las cuatro especies así como su procesamiento y análisis por qiime2 y R.

Con respecto al microbioma, encontramos que las especies de *A. andersoni* y *A. dumerilii*, ambas ubicadas en Michoacán, tuvieron una diversidad de bacterias y hongos similar. En *A. mexicanum* y *A. taylori*, especies ubicadas en Xochimilco y Alchichica, respectivamente, la comunidad bacteriana fue menos diversa a la observada en *A. andersoni* y *A. dumerilii* mientras que la comunidad de hongos fue bastante parecida entre todas las especies. El microbioma de las cuatro especies estuvo dominado por las clases de *Gammaproteobacteria* y *Bacteroidia*, para el caso de las bacterias, y por *Dothideomycetes*, para el caso de los hongos.

Al analizar el efecto de los factores abióticos sobre el microbioma, hallamos que el pH y el oxígeno disuelto tuvieron una correlación positiva con la diversidad alfa de bacterias y hongos en tanto que la conductividad tuvo una correlación negativa con esta en ambas comunidades. Asimismo, la temperatura promedio de 1990-2017 tuvo una correlación positiva con la diversidad alfa de bacterias mientras que la precipitación de 1990-2017 tuvo una correlación negativa con la diversidad alfa de hongos. Se observó que en las especies de *A. andersoni* y

A. dumerilii los factores abióticos tuvieron un efecto parecido sobre el microbioma. En cambio, estos factores impactaron de distinta manera al microbioma de *A. mexicanum* y *A. taylori*.

En conclusión, podemos sugerir que los factores abióticos tienen un efecto similar sobre el microbioma de aquellas especies que habitan en regiones cuyo clima y parámetros fisicoquímicos son semejantes.

Introducción

El microbioma de la piel de los anfibios y los factores que influyen sobre su estructura y diversidad

La piel es un ecosistema que posee una abundancia de pliegues, invaginaciones y microambientes, los cuales son hábitat de diversas comunidades de microbios, colectivamente referidas como microbioma (Byrd *et al.*, 2018; Harrison *et al.*, 2019). La piel, al estar en contacto directo con el ambiente que rodea al organismo, tiene el papel principal de ser una barrera física que lo protege de microorganismos transitorios o sustancias tóxicas que tienen el potencial de causar enfermedades (Grice y Segre, 2011; Loudon *et al.*, 2014a). De ahí que su caracterización sea esencial para los diversos grupos animales que se encuentran amenazados, como los anfibios (Alroy, 2015).

Los anfibios son una clase de vertebrados que poseen una piel delgada, permanentemente húmeda y cubierta de una capa de mucosa rica en carbohidratos (Heatwole y Barthalmus, 1994; Scheele *et al.*, 2019). Estas características permiten que su piel sea permeable al agua, capaz de realizar un intercambio de gases y particularmente susceptible a enfermedades (Varga *et al.*, 2019). Dicho órgano contribuye a la respiración y osmorregulación de los anfibios, a la par de funcionar como parte del sistema inmune innato (Varga *et al.*, 2019).

El microbioma de la piel de los anfibios se ha establecido como un sistema modelo para entender las relaciones tripartitas entre el hospedero, el microbioma y organismos patógenos (Bernardo-Cravo *et al.*, 2020). Esto debido a que se ha observado que la presencia de determinados microorganismos en la piel, así como los compuestos antifúngicos que son capaces de producir, permiten competir con otros microbios por espacio y recursos, inhibiendo el crecimiento de patógenos y protegiendo al hospedero (Kueneman *et al.*, 2016; Bletz *et al.*, 2017a-b; Bates *et al.*, 2018).

El microbioma de la piel de los anfibios está determinado por las interacciones que tiene la microbiota con los factores inherentes al hospedero, los factores bióticos y abióticos. Dentro de los factores inherentes al hospedero se incluyen la diversidad genética, su dieta y fisiología (ej. los sistemas inmunes innato y adaptativo) junto con su comportamiento, ecología y desarrollo (Rebollar *et al.*, 2020). Los factores bióticos incluyen las interacciones ecológicas entre los microbios simbiotes de la piel y la composición microbiana de las reservas ambientales mientras que los factores abióticos incluyen las condiciones ambientales, como la

temperatura, el pH, la humedad y la presencia de contaminantes (Rebollar *et al.*, 2016a; Jiménez *et al.*, 2016).

El efecto del ambiente en el microbioma de la piel de los anfibios

Aún cuando todos estos factores impactan al microbioma de la piel de los anfibios, en vista de los rápidos cambios ambientales en todo el mundo, se cree que los factores abióticos pueden alterar más fácilmente el balance del microbioma, repercutiendo en la salud del hospedero y la selección y evolución de los anfibios (Kueneman *et al.*, 2019; Ruthsatz *et al.*, 2020). De acuerdo con esto, se ha observado que la riqueza bacteriana de múltiples especies de anfibios distribuidos a lo largo del mundo aumenta con factores asociados a la temperatura (en particular con temperaturas frías y la estación), sugiriendo que la composición bacteriana cambia a lo largo de un gradiente y que la riqueza bacteriana del hospedero decrece en ambientes más térmicamente estables (Kueneman *et al.*, 2019).

No obstante, la temperatura no es el único factor abiótico con un efecto sobre el microbioma. Anteriormente, se ha observado que la riqueza y estructura bacteriana del microbioma de 71 especies de ranas arborícolas a lo largo del Bosque Atlántico estaban significativamente influenciadas por la elevación, la latitud y algunas variables climáticas, como la precipitación anual (Ruthsatz *et al.*, 2020), aún y cuando las regiones de donde se recuperaron a los individuos eran ampliamente heterogéneas. Si bien estas conclusiones han surgido a partir del análisis de las comunidades bacterianas, García-Sánchez *et al.* (2022) observaron que también existe una correlación significativa entre las comunidades de hongos y el clima, principalmente con las variables de temperatura por temporada, precipitación anual y precipitación del cuartil más húmedo.

Con respecto a la precipitación, Varela *et al.* (2018) evidenciaron que el microbioma de las ranas panameñas varía menos en aquellas expuestas a climas más húmedos; concluyendo así que la precipitación es un factor capaz de hacer más similares el microbioma de la piel de diferentes especies. Estas evidencias apuntan a que la exposición a condiciones ambientales semejantes promueve la presencia de comunidades microbianas parecidas en la piel, a pesar de tratarse de distintas especies.

Por otro lado, se ha demostrado que los factores abióticos pueden afectar al microbioma del hospedero a través de 1) modificar la reserva de microorganismos disponible en su hábitat (Bletz *et al.*, 2017a) y 2) al promover condiciones favorables para el desarrollo de patógenos, como *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) (Bielby *et al.*, 2008), patógeno causante de la

enfermedad fúngica llamada quitridiomycosis. Con respecto al primer caso, estos cambios provocan que el hospedero modifique su microbiota de acuerdo a los microorganismos disponibles en el ambiente (Bletz *et al.*, 2017a). Por ejemplo, se ha observado que la falta de un reservorio bacteriano, como el bacterioplancton, promueve un microbioma menos diverso (Loudon *et al.*, 2014b). En cuanto al segundo caso, se ha reportado que anfibios sanos presentan un microbioma distinto al de los individuos infectados por Bd (Rebollar *et al.*, 2016b), aumentando las probabilidades de su deceso. Considerando esto y las evidencias de que se puede favorecer la quitridiomycosis en regiones constantemente húmedas, fuertemente asociadas a hábitats acuáticos perennes y/o en donde ocurren aumentos grandes en la variabilidad de las condiciones climáticas (ej. temperatura), es que resulta relevante conocer cómo está conformado el microbioma del anfibio y cómo lo puede modificar el ambiente.

Los ajolotes, unos anfibios muy peculiares

En México, la riqueza de anfibios incluye a poco más de 400 especies (Frost, 2013), equivalente al 5.23% del total mundial; de ahí que esté posicionado como el quinto país más diverso de anfibios, justo después de Brasil, Colombia, Ecuador y Perú (Parra-Olea *et al.*, 2014). De las 400 especies, 252 son endémicas en México, equivalente al 67% de la diversidad total, y 164 están amenazadas, equivalente al 43% de la diversidad total (Parra-Olea *et al.*, 2014). Dentro de éstas se encuentran los ajolotes, especies de interés debido a sus capacidades regenerativas, funciones ecosistémicas e importancia cultural (SEMARNAT, 2018).

Los ajolotes son anfibios del género *Ambystoma*. Este género está constituido por 33 especies descritas, las cuales se distribuyen desde el suroeste de Alaska y el sur de Canadá hasta el Altiplano Mexicano (Pough *et al.*, 2001). En el caso particular de los ajolotes, existen 17 especies descritas, de las cuales 16 se reportan como endémicas a México, y de acuerdo a la NOM-059-SEMARNAT-2010, 3 están clasificadas como amenazadas y 12 sujetas a protección especial. Dicho estado de riesgo se debe a la sobreexplotación causada por ser utilizados como comida o propósitos medicinales y al daño a su hábitat (SEMARNAT, 2018).

Estos animales presentan un cuerpo robusto de una longitud promedio de 23cm, con surcos costales a los lados, una cabeza ancha y una piel lisa, glandular y húmeda (SEMARNAT, 2018). A diferencia de otros anfibios (Ohmer *et al.*, 2017), los ajolotes no mudan de piel; este proceso únicamente se ha observado en condiciones de enfermedad y estrés (Farkas y Monaghan, 2015). El periodo de reproducción de los ajolotes ocurre principalmente en primavera, mas en algunas especies este puede extenderse hasta verano (Krebs & Brandon, 1984). La mayoría de

las especies pasan por un proceso de metamorfosis durante el cual los individuos en etapas larvarias transicionan a adultos acompañado de una serie de cambios fisiológicos, como la reabsorción de la cola, el desarrollo de extremidades y el remodelamiento de músculos, corazón y piel (Brown y Cai, 2007). No obstante, existen algunas especies que son pedomórficas obligadas, pues alcanzan la madurez sexual reteniendo características larvarias; tal es el caso de *Ambystoma andersoni*, *Ambystoma dumerilii*, *Ambystoma mexicanum* y *Ambystoma taylori* (Farkas y Monaghan, 2015).

La mayoría de las especies se distribuyen en el Eje Neovolcánico Transmexicano (ENT) (SEMARNAT, 2018), donde suelen habitar lagos y arroyos cuyas características fisicoquímicas les han permitido adecuarse exclusivamente a estos sitios (SEMARNAT, 2018). El ENT se caracteriza por ser una gran masa de rocas volcánicas de diversos tipos que cruza el territorio mexicano desde Nayarit hasta Veracruz (Suárez-Mota & Téllez-Valdés, 2014). A pesar de que se reconoce como un centro de diversificación, de endemismo de anfibios y reptiles y de transición biogeográfica para una gran variedad de especies (Suárez-Mota & Téllez-Valdés, 2014), esta región es una de las más perturbadas en el país a causa de los asentamientos urbanos, carreteras y áreas agrícolas (Monroy-Vilchis *et al.*, 2019). A escala global y continental se ha predicho que el ENT, junto con la Sierra Madre Oriental y la Sierra Madre Occidental, presentan las condiciones ideales de temperatura, precipitación y vegetación para el desarrollo de Bd (Bolom-Huet *et al.*, 2019). Asimismo, estudios de cambio climático han predicho un incremento del 2-3°C para el año 2050 en el ENT, amenazando así a las múltiples poblaciones de anfibios que habitan la región (Nava-González *et al.*, 2019).

Contrario a los estudios desarrollados en otras especies de anfibios, es poca la información que se tiene disponible con respecto a los ajolotes. Hasta el momento únicamente se ha descrito el microbioma de la piel de dos especies pedomórficas facultativas; *A. rivulare* (Nava-Gonzalez *et al.* 2021), cuyo microbioma se ve afectado por la infección por Bd, y *A. altamirani* (Martínez-Ugalde *et al.* 2022), cuyo microbioma está influenciado por variaciones estacionales de temperatura, pH, oxígeno disuelto y conductividad.

Planteamiento del problema

Las interacciones que tiene el microbioma con los factores abióticos, así como con los factores bióticos e inherentes al hospedero, influyen en la determinación de las comunidades bacterianas y de hongos que se encuentran presentes en la piel de los anfibios. Previos estudios ha reportado que las variaciones en la temperatura y precipitación tienen un efecto sobre las comunidades microbianas de la piel, haciéndolas más parecidas incluso entre distintas especies.

De las múltiples especies de anfibios en México, los ajolotes son de especial interés debido a sus funciones ecosistémicas e importancia cultural a lo largo del Eje Neovolcánico Transmexicano, región donde se desarrolla la mayoría. Si bien múltiples especies de ajolotes alternan su ciclo de vida entre el ambiente acuático y terrestre, existen cuatro que tienen una distribución restringida, desarrollándose en su totalidad en un solo hábitat acuático. En consecuencia, cualquier modificación ambiental que ocurra resulta una potencial amenaza, comprometiendo las funciones que tiene el ajolote en el sitio, su salud y las interacciones que tiene su microbioma.

Hasta el momento únicamente se conoce que las variaciones temporales de las condiciones fisicoquímicas y la infección por Bd son capaces de alterar el microbioma de la piel en ajolotes pedomórficos facultativos. No obstante, se carece de esta información con respecto al resto de los ajolotes. De acuerdo con esto y a la importancia que tiene el ambiente en la sobrevivencia de los ajolotes pedomórficos obligados, es que este trabajo busca realizar la primera evaluación del microbioma de la piel y su relación con el ambiente.

Hipótesis

La comunidad microbiana de la piel será parecida entre los ajolotes pedomórficos obligados cuyos factores abióticos sean similares.

Objetivos

General

Describir las comunidades microbianas de cuatro especies de ajolotes y determinar el posible efecto de los factores abióticos sobre éstas.

Particulares

1. Describir las condiciones climáticas (precipitación y temperatura) reportadas de 1970-2017 y los parámetros fisicoquímicos (pH, temperatura, oxígeno disuelto y conductividad) de la laguna en donde habita cada especie.
2. Describir la diversidad y composición de las comunidades microbianas (bacterias y hongos) que habitan en la piel de cada especie.
3. Identificar si las condiciones climáticas y los parámetros fisicoquímicos influyen en la diversidad y composición de las comunidades microbianas de la piel.

Sistema de estudio

Ambystoma andersoni - Laguna de Zacapu, Michoacán, México

Los individuos de esta especie tienen una longitud de 162-235 mm, alcanzan la madurez sexual a los 90 mm y 12 meses de edad, presentan una coloración naranja oscuro con manchas negras a lo largo del cuerpo y se alimentan de invertebrados terrestres y acuáticos (Aguilar-Miguel, 2005). En la NOM-059-SEMARNAT-2010 tiene la categoría de protección especial (Pr) y de acuerdo con la Lista Roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) está en la categoría de en peligro crítico (Cr). Esta especie se distribuye únicamente en la laguna de Zacapu (Fig. 1a), ubicada dentro de la subcuenca del río Angulo, tributario de la Cuenca Lerma-Chapala en el estado de Michoacán.

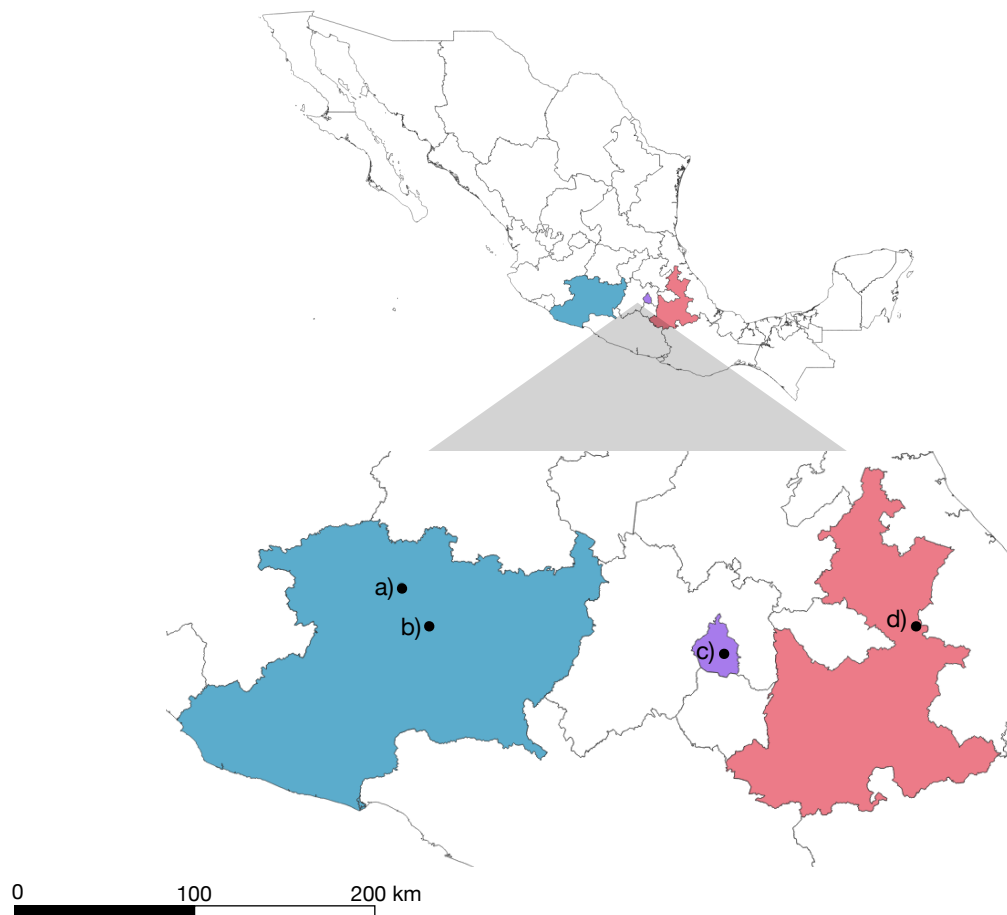


Figura 1. Sitios de muestreo

a) Laguna de Zacapu, Michoacán, b) Laguna de Pátzcuaro, Michoacán, c) Centro de Investigaciones Biológicas y Acuícolas de Cuernavaca (CIBAC), Ciudad de México y d) Laguna de Alchichica, Puebla. Cada estado se representa en un color distinto. Todos los sitios muestreados forman parte del Eje Neovolcánico Transversal.

La laguna de Zacapu es un remanente de la desecación y canalización de la Ciénaga de Zacapu, cuyos pantanos y lagos fueron drenados desde 1900 (Pétrequin, 1994); fungiendo así como un refugio para varias especies de la zona. La laguna tiene una longitud de 0.635 km,

una superficie de 0.216 km², una profundidad máxima de 14 m y ubicada a una altitud de 1,980 msnm (Tabla 1). Sus suelos son muy fértiles y ricos en materia orgánica y nutrientes provenientes de las rocas basálticas que lo conforman (SEMARNAT, 2004a). De ahí que ésta represente para la localidad de Zacapu un lugar de actividades domésticas y recreativas, un generador de fuentes de trabajo y parte de la identidad cultural, lo que motiva el interés de la municipalidad y de la sociedad del lugar por conocer el tipo y la situación de los recursos con los que cuenta el cuerpo de agua (Pétrequin, 1994). Sin embargo, como resultado de que por muchos años se vertieron aguas negras provenientes de la ciudad y desechos del rastro municipal se han provocando impactos perceptibles en la laguna (SEMARNAT, 2004a).

Tabla 1. Características generales de los sitios que habitan los ajolotes				
	Laguna de Zacapu	Laguna de Pátzcuaro	CIBAC	Laguna de Alchichica
Coordenadas	19°49'29"N 101°47'15"O	19°38'00"N 101°38'00"O	19° 16' 55"N 99° 6' 11"O	19°24'49.64"N 97°24'13.24"O
Ubicación general	Dentro de la subcuenca del río Angulo, tributario de la Cuenca Lerma-Chapala.	Dentro de una cuenca interior y endorreica.	En la delegación de Xochimilco, CDMX	En la parte central de la cuenca Libres-Oriental, Puebla
Altitud (msnm)	1,980	2,035	2,250	2,345
Longitud (km)	0.635	55	-----	1.73
Superficie (km ²)	0.216	260	-----	1.81
Profundidad (m)	Máxima: 14	Media: 5 Máxima: 8	-----	Media: 38.59 Máxima: 64.61
Clima al que está expuesta	Templado y moderadamente húmedo	Templado y subhúmedo	Templado y subhúmedo	Seco
Suelos	Son rocas basálticas ricas en calcio, magnesio, hierro y moderadamente ricas en potasio y calcio, y pobres en fósforo.	Es mineral, principalmente dominado por arcillas y limos	-----	Constituido por sedimentos tales como arena, arcillas, lutita y caliza

***Ambystoma dumerilii* - Laguna de Pátzcuaro, Michoacán, México**

Los individuos de esta especie tienen una longitud de 142 mm, alcanzan la madurez sexual a los 16 meses de edad, son de una coloración verde claro, con tonalidades violeta y café y se alimentan de acociles, plancton, crustáceos, insectos, moluscos y peces pequeños (Aguilar-Miguel, 2005). Se considera un animal epibentónico, pero puede encontrarse en todos los estratos de la columna de agua. En la NOM-059-SEMARNAT-2010 tiene la categoría de protección especial (Pr) y de acuerdo con la Lista Roja de la UICN está en la categoría de en

peligro crítico (Cr). Esta especie se distribuye únicamente en la laguna de Pátzcuaro, Michoacán (Fig. 1b).

La laguna de Pátzcuaro reside en una bahía terminal rodeada de montañas volcánicas, por lo que no tiene flujo de salida hacia otro cuerpo de agua (SEMARNAT, 2004b). La laguna tiene una longitud de 55 km, una superficie de 260 km², una profundidad máxima de 8m y ubicada a una altitud de 2,035 msnm (Tabla 1). Sus suelos, formados sobre una secuencia de sedimentos y depósitos de ceniza volcánica, son minerales y dominados por arcillas y limos, permitiendo la actividad agrícola alrededor de la cuenca de la laguna (SEMARNAT, 2004b). Ésta ha pasado por múltiples cambios ambientales en los últimos 50 años, principalmente derivados de la contaminación causada por el vertido de aguas residuales y los residuos sólidos arrojados al agua generados en las inmediaciones de los poblados de Pátzcuaro, Tzintzuntzan, Quiroga, San Jerónimo Purenchécuaro y Erongarícuaro; provocando así una disminución de la profundidad, el aumento en la turbidez, la disminución del oxígeno disuelto y la eutrofización del lago; todo esto a su vez repercutiendo sobre las especies que habitan en la misma (Ramírez y Domínguez, 2015; SEMAR, s.f).

***Ambystoma mexicanum* - Centro de Investigaciones Biológicas y Acuícolas de Cuernavaca, Ciudad de México, México**

Los individuos de esta especie tienen una longitud de 133 mm, alcanzan la madurez sexual a los 12 meses, son de una coloración café oscuro con numerosas manchas rosas dispersas en todo el cuerpo y se alimentan de pequeños crustáceos, insectos, hojas de planta y caracoles (Aguilar-Miguel, 2005). En la NOM-059-SEMARNAT-2010 tiene la categoría de protección especial (Pr) y de acuerdo con la Lista Roja de la UICN está en la categoría de en peligro crítico (Cr). Esta especie se distribuye en el centro del país, en el límite suroeste de la Ciudad de México en canales y humedales de Xochimilco. Se cree que esta especie tenía una amplia distribución en el Valle de México, Texcoco y Zumpango, pero ha desaparecido de esas localidades (Zambrano *et al.*, 2010). Adicionalmente, se conoce una población en el parque Chapultepec en la Ciudad de México, la cual ha sido estudiada anteriormente (Recuero *et al.*, 2010).

Desde hace unos 13 años, los ajolotes de la especie *A. mexicanum* y cualquier otro organismo en situación de riesgo que habita la zona de Xochimilco son manejados por el Centro de Investigaciones Biológicas y Acuícolas de Cuernavaca (CIBAC) de la Universidad Autónoma Metropolitana, registrado por la SEMARNAT como Unidad de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre (UMA), a fin de lograr su conservación (Fig. 1c) (Ocampo, s.f.). Dentro del

CIBAC los ajolotes se conservan en mesocosmos, ubicados a una altitud de 2,250 msnm (Tabla 1) y cuya agua proviene de las plantas de tratamiento, las cuales eliminan posibles patógenos, remueven el exceso de nutrimentos y metales pesados, además de que retiene toda la materia suspendida (Ocampo, s.f.).

***Ambystoma taylori* - Laguna de Alchichica, Puebla, México**

Los individuos de esta especie tienen una longitud promedio de 76 mm, los ejemplares neoténicos son de color amarillo brillante con manchas oscuras y se alimentan de invertebrados terrestres y acuáticos pequeños (Aguilar-Miguel, 2005). En la NOM-059-SEMARNAT-2010 tiene la categoría de protección especial (Pr) y de acuerdo con la Lista Roja de la UICN está en la categoría de en peligro crítico (Cr). Su distribución está restringida a la laguna de Alchichica, en el Municipio de Tepehuayo, Puebla (Fig. 1d).

La laguna de Alchichica corresponde a un cuerpo de agua formado tras la explosión de material ígneo y erosión natural de cráteres (Alcocer *et al.*, 2000), el cual tiene una longitud de 1.73 km, una superficie de 1.81 km², una profundidad máxima de 64.61 m y ubicada a una altitud de 2,345 msnm (Tabla 1). Sus suelos están constituidos por arena, arcillas, lutita y caliza. Esta laguna funge como un sumidero de carbono la mayor parte del año (Oseguera *et al.*, 2015). La cuenca es altamente susceptible a la desertificación, pues la tala y aclareo del bosque, sobrepastoreo y sobreexplotación agrícola del suelo que se lleva a cabo en la zona junto con las lluvias torrenciales que en ocasiones ocurren en el área, contribuyen a la aceleración de los procesos erosivos (Alcocer *et al.*, 2004) y a la disminución del nivel del lago.

Metodología

Parte I.

Esta parte de la metodología fue realizada por múltiples compañeras y compañeros del Laboratorio de la Dra. Eria Rebollar de Microbiología Genómica, en el Centro de Ciencias Genómicas (CCG), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Muestreo del microbioma de la piel

El muestreo del microbioma se realizó en *A. andersoni*, *A. taylori*, *A. dumerilii* y *A. mexicanum*, especies de ajolotes pedomórficos. La distribución de cada especie está restringida a la laguna en donde habita; de ahí que no se pudieron obtener más poblaciones que las observadas en cada sitio. Las muestras se tomaron bajo un mismo periodo (entre abril y mayo del 2021) con el propósito de que las condiciones ambientales correspondieran a la misma estación (primavera). Sin embargo, para el caso de *A. dumerilii* fue necesario realizar muestreos en junio, julio y octubre, pues no se encontraban suficientes individuos. En total se tomó la muestra del microbioma de 94 individuos adultos: 30 individuos de *A. andersoni* (20 machos y 10 hembras), 24 de *A. taylori* (11 machos, 10 hembras y 3 cuyo sexo no fue definido), 13 de *A. dumerilii* (3 machos y 10 hembras) y 27 de *A. mexicanum* (9 machos, 15 hembras y 3 cuyo sexo no fue definido).

Los ajolotes fueron capturados de manera manual mediante el empleo de redes para peces usando guantes de látex estériles (Martínez-Ugalde *et al.*, 2022). Una vez que se capturaba al individuo, éste se colocaba cuidadosamente en un contenedor de plástico que previamente había sido llenado con agua de la laguna (Martínez-Ugalde *et al.*, 2022). Este contenedor se tapó y colocó fuera de la luz del sol para que mantuviera su temperatura. Se utilizó un contenedor diferente por cada individuo.

Una vez fuera del cuerpo de agua, se enjuagó al ajolote con 25 mL de agua destilada estéril a fin de remover la mayor cantidad de bacterias transitorias (Martínez-Ugalde *et al.*, 2022). Después, se frotó la piel del individuo con dos hisopos de rayón, pasando ambos hisopos 5 veces (ida y vuelta) por la parte dorsal, ventral y en las coyunturas de cada una de las extremidades, sumando un total de 30 veces (Martínez-Ugalde *et al.*, 2022). Posteriormente, uno de los frotis se colocaba en un tubo Eppendorf con 170 uL de DNA Shield (Zymo Research, Irvine CA, USA) y se almacenaba a 4 °C durante el trabajo de campo. Una vez en el laboratorio, este se almacenaba a -80 °C hasta su uso para el procesamiento del microbioma.

Muestreo de datos fisicoquímicos

Con el objetivo de realizar una caracterización del ambiente de cada especie, al momento del muestreo se registraron las mediciones de temperatura, pH, oxígeno disuelto y conductividad; los dos últimos se realizaron mediante el uso del multiparámetro HANNA HI98194 (HANNA Instruments, USA). Las mediciones se tomaron en cada locación por triplicado en un transecto de 10 m.

Extracción del DNA, preparación de bibliotecas del 16S y secuenciación de fragmentos del gen 16SrRNA e ITS

El DNA fue extraído de los hisopos preservados en DNA Shield de acuerdo a las instrucciones del fabricante del kit de DNeasy Blood and Tissue (Qiagen, Valencia, CA, USA).

Para caracterizar el microbioma bacteriano el DNA fue utilizado para amplificar la región V4 del gen 16S rRNA usando los cebadores con código de barras (F515/R806) y las condiciones de PCR adaptadas de Caporaso *et al.* (2011). Los amplicones fueron cuantificados utilizando el qubit v4 (ThermoFisher Scientific). Posteriormente, se obtuvieron muestras compuestas mediante la combinación de radios equimolares de los amplicones de muestras individuales, seguido de una limpieza con el kit QIAquick PCR clean up (Qiagen, Valencia, CA, USA). Los productos de PCR conjuntos fueron mandados al Dana Farber Cancer Institute's Molecular Biology Core Facilities (Boston, MA, USA) para secuenciación Illumina MiSeq 250PE. Para caracterizar el microbioma de los hongos, las muestras de DNA se cuantificaron y se mandaron a University of Minnesota Genomics Center: UMGC (MN, USA) para la preparación de bibliotecas de ITS y la secuenciación de Illumina MiSeq 250 PE.

Parte II.

Esta parte de la metodología fue realizada por mí bajo la asesoría de la Dra. Rebollar.

Procesamiento de secuencias y asignación taxonómica de las secuencias 16S e ITS

Los datos obtenidos a partir de la secuenciación fueron procesados utilizando QIIME2 2022.2 (Bolyen *et al.*, 2019). Las secuencias en crudo fueron filtradas por calidad, seguido del proceso de eliminación de quimeras y desreplicación con DADA2 (Callahan *et al.*, 2016). Se obtuvieron un total de 4, 012, 236 lecturas de las secuencias de 16S y 12, 405, 881 lecturas de ITS. Debido a que el promedio de calidad de ciertas bases de las secuencias era menor a 25, se removieron de las secuencias de 16S las primeras 12 bases tanto de la secuencia *forward* como *reverse*. En el caso de las secuencias de ITS, se removieron las primeras 30 bases de la secuencia *reverse* y se truncaron las secuencias en las bases 220 y 170 para las secuencias *forward* y *reverse*, respectivamente. El 70-80% de las secuencias de 16S pasaron los filtros, fueron empalmadas y resultaron ser no quiméricas mientras que, debido a la mala calidad de las secuencias ITS, solo el 30-50% de las secuencias pasaron por este proceso. El número final de lecturas para 16S fue de 3,077,888 y de 4,338,606 para ITS.

A todas las variantes de secuencia de amplicon resultantes (ASV, por sus siglas en inglés), obtenidas con QIIME2 2022.2 (Bolyen *et al.*, 2019), se les asignó una taxonomía. Para las secuencias de 16S se empleó el clasificador de taxonomía ya entrenado, Silva 138 99% OTUs F515/R806, en el cual las secuencias de referencia de las ASVs se obtuvieron para la región V4 del gen 16S rRNA usando los cebadores con código de barras (F515/R806) y se agruparon con el 99% de similitud. Para ITS se entrenó un nuevo clasificador utilizando la base de datos de UNITE v.2021 (Nilsson *et al.*, 2018), pues QIIME2 no contaba con un clasificador ya entrenado.

Una vez asignada la taxonomía, se removieron todos los contaminantes (mitocondrias y cloroplastos). Posteriormente, todos los ASVs fueron alineados con mafft (Katoh *et al.*, 2002) y utilizados para construir una filogenia con fasttree2 (Price *et al.*, 2010). Finalmente, se rarefaccionaron las secuencias a una profundidad de secuenciación de 11,167 para las 16S y 5, 904 para las de ITS; en el Anexo 1 se observan las curvas antes y después de la rarefacción. Se eligieron estos cortes, pues de esta forma se conservaba el mayor número de muestras al mismo tiempo que se alcanzaban las asíntotas de las curvas. Con respecto a las secuencias de 16S, únicamente se perdieron 2 de 93 muestras, de las cuales 1 correspondía a *A.*

andersoni y la otra a *A. mexicanum*. En el caso de las secuencias de ITS, se perdieron 11 de las 92 muestras, de las cuales 10 correspondía a *A. andersoni* y 1 a *A. dumerilii*.

Análisis de diversidad de las comunidades bacterianas y de hongos

Una vez obtenidas las tablas rarefaccionadas de ASVs, la taxonomía y el árbol filogenético, se realizaron los análisis estadísticos y de diversidad utilizando las paqueterías de qiime2R (Bisanz, 2018), la cual permite exportar a R los datos ocupados en QIIME2, sus resultados asociados y la metadata, y phyloseq (McMurdie & Holmes, 2013), la cual permite la manipulación, análisis estadístico y visualización de datos taxonómicos.

Para el estudio del microbioma comúnmente se emplean estimadores de diversidad, de los cuales los más ocupados son la diversidad alfa y beta. La diversidad alfa nos permite conocer la diversidad de las especies encontradas en una muestra mientras que la diversidad beta compara las diferencias en la diversidad entre muestras. En este trabajo, tanto para hongos como para bacterias, la diversidad alfa a nivel de ASVs se calculó a partir de los ASVs observados y el índice de Shannon. Se eligió el índice de Shannon pues este considera tanto el número de especies presentes como la abundancia relativa de cada una, lo que me permitió distinguir los sitios en los que solo unas cuantas especies predominan de aquellos en los que cada especie tiene una influencia similar en toda la diversidad. Para bacterias adicionalmente se calculó la diversidad filogenética de Faith, esta a diferencia de los otros indicadores incorpora información de las relaciones filogenéticas entre las especies de una muestra. Se realizó la prueba de Shapiro-Wilk para definir si los datos tenían una distribución normal. Debido a que los resultados demostraron ser no normales, se ocupó el test de Kruskal-Wallis y una prueba pareada de Wilcoxon para determinar si las diferencias de diversidad alfa observadas eran significativas.

En el caso de la diversidad beta, se calculó el índice de disimilitud de Bray-Curtis, basado en los datos de abundancia, y la distancia de Jaccard, basada en la presencia/abundancia de las especies. Para las secuencias de 16S también se calcularon las distancias de Unifrac ponderadas y no ponderadas. Los resultados de diversidad beta se representaron mediante PCoAs. Para determinar si la varianza observada en la estructura de la comunidad podía ser explicada por las diferentes especies se realizó el análisis permutacional multivariado de varianza (PERMANOVA; Anderson, 2001) usando la función adonis de la paquetería de vegan (Oksanen *et al.*, 2013). Esta paquetería provee herramientas para realizar análisis de diversidad, ordenación y disimilitud.

Para conocer la composición taxonómica de las comunidades bacterianas y de hongos, se analizó la abundancia relativa a nivel de clase mediante un gráfico de barras apiladas, descartando para su identificación a los ASVs con una abundancia menor al 0.1%. Igualmente, se realizó un gráfico UpSet para identificar los ASVs únicos y compartidos entre especies. Éste fue realizado mediante la función `upset` perteneciente a la paquetería `UpSetR` en RStudio (Conway *et al.*, 2017; RStudio Team, 2020), la cual permite crear visualizaciones de las agrupaciones en común de dos o más grupos. A partir de los ASVs compartidos se realizó un mapa de calor, utilizando la función `plot_core` de la paquetería `microbiome` en RStudio (Leo *et al.*, 2017; RStudio Team, 2020), para representar a las clases y órdenes a los que correspondían esos ASVs y su abundancia relativa en las diferentes especies. La paquetería `microbiome` brinda herramientas para la manipulación, análisis estadístico y visualización de datos taxonómicos.

Se realizó el análisis de discriminante lineal con efecto del tamaño (LEfSe) en Python y la paquetería de `ggplot2` en RStudio (RStudio Team, 2020), paquetería enfocada en la creación de gráficos, para identificar que clases de bacterias y hongos son diferencialmente abundantes entre las especies de estudio. LEfSe primero realiza una prueba de Kruskal-Wallis para detectar las diferencias significativas en abundancia de los grupos taxonómicos e identificar a los grupos a los que pertenecen estas diferencias. Después, realiza pruebas pareadas para determinar si estas diferencias son biológicamente consistentes (ej. dada la estructura de una población en un set de muestras es un componente (especie) más abundante en todas las subclases de la población o solo en una). Finalmente, utiliza el análisis de discriminante lineal (LDA) para estimar el tamaño del efecto de cada componente (especie) diferencialmente abundante.

Obtención de datos climáticos

Los datos de precipitación y temperatura de las diferentes localidades fueron obtenidos del Sistema de Información Hidrológica (SIH). El SIH contiene datos recientes e históricos de estaciones convencionales y automáticas climatológicas e hidrométricas de la red de CONAGUA y de otras dependencias del Gobierno Federal. Si bien, el SIH reporta la existencia de múltiples estaciones dentro de los municipios en los que habitan los ajolotes, varias de éstas ya no están en funcionamiento. De ahí que las seleccionadas fueron aquellas que se reportan como activas; en la Figura 2 se muestra que tan distantes están las estaciones de nuestros sitios de muestreo.

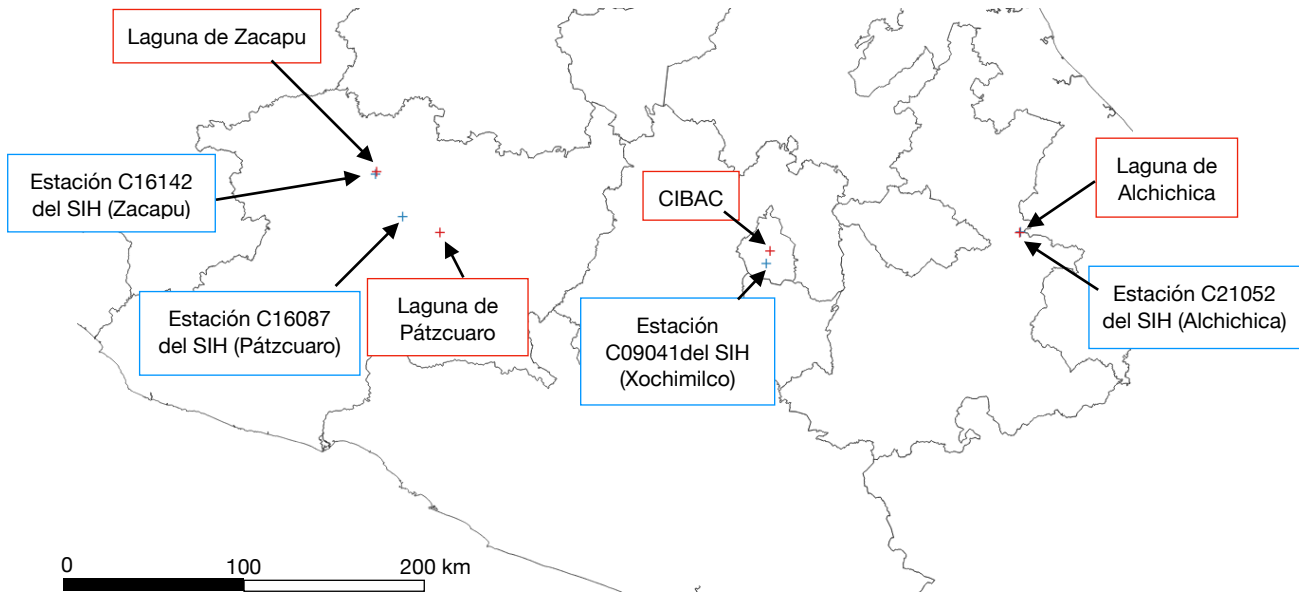


Figura 2. Ubicación de los sitios donde habitan las distintas especies de ajolotes con respecto a la estación climática del SIH. Las cruces rojas representan las coordenadas en las cuales se realizó la toma de las mediciones fisicoquímicas por los miembros del laboratorio. Las cruces azules representan las coordenadas en donde están ubicadas las estaciones del SIH de las que se recopilaban los datos climáticos.

Procesamiento de los datos bioclimáticos

A fin de recuperar la mayor cantidad de información posible de las condiciones climáticas de cada municipio, pues los datos no se encuentran completos para todos los años, se seleccionaron los años de acuerdo al número de registros que se encontraban disponibles, el cual se decidió que fuera mayor o igual a 300 registros por año. Una vez seleccionados, se obtuvo para cada año el acumulativo de la precipitación, valor que nos indica la precipitación anual, y la temperatura promedio. Estos datos fueron ocupados para describir los patrones de precipitación y temperatura a lo largo del tiempo mediante gráficos de línea y estacionales ocupando las paqueterías de ggplot2 (Wickham, 2016) y forecast (Hyndman *et al.*, 2022) en RStudio (RStudio Team, 2020). La estadística se realizó únicamente para los datos de temperatura debido a que al calcular el acumulativo de la precipitación se obtuvo un solo valor por año.

Para visualizar las anomalías de precipitación y temperatura, primero se calculó la precipitación y la temperatura mensual ocurrida desde 1970 hasta 2017. En el caso de la precipitación, se obtuvo el valor acumulativo mensual mientras que para la temperatura se calculó la temperatura mensual promedio. Luego, se calculó el valor de referencia mediante calcular el valor promedio del mes (sin clasificar por año) de precipitación y temperatura. Después, se calcularon las anomalías de cada parámetro. Para la precipitación, la anomalía fue

calculada a partir de multiplicar cada valor individual (ej. la precipitación acumulativa ocurrida en enero de 1970) por 100 (para poder expresarla en porcentaje), dividir este resultado sobre el valor de referencia y restarle a ese valor el 100. En el caso de la temperatura, únicamente se le restó a cada valor individual (ej. la temperatura promedio de enero de 1982) el valor de referencia. Adicionalmente, se calculó para cada mes el valor máximo, mínimo, los cuartiles y el rango intercuartil. Estos análisis se realizaron ocupando el código descrito por Dominic Royé, disponible en: <https://dominicroye.github.io/en/2019/visualize-monthly-precipitation-anomalies/>. Las especificaciones para realizar este análisis con los datos de la temperatura se tomaron del código descrito por Dominic Royé, disponible en: <https://dominicroye.github.io/en/2020/visualize-climate-anomalies/>.

Análisis de los factores abióticos

Las mediciones de pH, temperatura, oxígeno disuelto y conductividad, tomadas al momento del muestreo, se representaron en gráficos de caja y bigotes. Se realizó la prueba de Shapiro-Wilk para definir si los datos tenían una distribución normal. Debido a que los resultados demostraron ser no normales, se ocupó el test de Kruskal-Wallis y una prueba pareada de Wilcoxon para determinar si las diferencias observadas entre las mediciones de estos parámetros eran significativas. Adicionalmente, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) utilizando los parámetros fisicoquímicos (pH, temperatura, conductividad y oxígeno disuelto) y climáticos (precipitación anual y temperatura promedio de 1990-2017) para identificar las similitudes entre lagunas. En el caso de los factores climáticos, se decidió emplear únicamente los datos climáticos de 1990-2017, puesto que fue a partir de 1990 que existen anomalías en la precipitación y temperatura. Una vez obtenido el valor de precipitación anual y temperatura promedio de cada año desde 1990 hasta 2017, se obtuvo la mediana de cada parámetro y ese fue el valor ocupado para los análisis posteriores.

Análisis de correlación entre los factores abióticos y las comunidades bacterianas y de hongos

Para identificar si los factores abióticos tienen un efecto sobre la diversidad y composición de las comunidades microbianas de la piel, se evaluó cada factor fisicoquímico medido al momento del muestreo y la precipitación anual y temperatura promedio de 1990 a 2017.

Se realizaron modelos de regresión lineal para conocer cómo es la relación entre dos variables y si el valor de una se puede predecir a partir del valor de la otra. Estos fueron realizados ocupando la función `lm` de la paquetería `stats` de RStudio (RStudio Team, 2020), la cual

permite realizar múltiples cálculos estadísticos. En este trabajo se realizaron estos modelos de regresión lineal con el objetivo de conocer como los factores abióticos modifican la diversidad alfa, calculada con el índice de Shannon.

Asimismo, se realizó un análisis de distancia basado en redundancia (dbRDA). El dbRDA nos permitió identificar si los parámetros climáticos y fisicoquímicos tenían algún impacto en las disimilitudes observadas entre las comunidades de bacterias y hongos. Para esto, el dbRDA ocupa una matriz de distancias para realizar un análisis de coordenadas principales (PCoA). Posteriormente, con los resultados de este PCoA se realiza un análisis de redundancia (RDA). En nuestro caso, este análisis se realizó ocupando la matriz de distancias calculada con el índice de Bray-Curtis a partir de los datos de diversidad y usando la función `cal_ordination` proveniente de la paquetería `microeco` (Liu *et al.*, 2021), la cual tiene herramientas que facilitan el análisis y manejo de los datos de microbioma.

Adicionalmente, se realizó un mapa de calor para representar la correlación, calculada con el índice de Spearman, entre las clases de bacterias y hongos con el PC1 y PC2 del PCA realizado a partir de los datos abióticos obtenidos para cada laguna (parámetros fisicoquímicos, precipitación anual y temperatura promedio de 1990-2017). Este análisis fue realizado con las funciones `cal_cor` y `plot_cor` de la paquetería `microeco` (Liu *et al.*, 2021). Se optó por realizar la correlación con los PCs y no directamente con los factores ambientales debido a que cada PC refleja más de una variable lo que nos permite reducir dimensiones e inferir cual puede ser la influencia que tienen unos con otros en la naturaleza.

Resultados

Capítulo 1. Variaciones climáticas y fisicoquímicas presentadas en los sitios de estudio

1.1 La precipitación y temperatura de cada sitio ha presentado cambios desde 1990

Con el objetivo de describir las condiciones climáticas en las que se han desarrollado las diferentes especies de ajolotes a lo largo del tiempo en su hábitat, se describieron los patrones y anomalías de precipitación y temperatura anual de las diferentes localidades desde 1970 hasta el último registro disponible en 2017.

Con respecto a la precipitación anual (Fig. 3a), se observó que la precipitación en Zacapu es bastante variable año con año oscilando entre 600-1100 mm. En Pátzcuaro, la precipitación anual osciló entre 700-1000 mm. En Xochimilco, la precipitación de 1970 a 1989 se mantuvo en un rango de 600-1000 mm. Sin embargo, a partir de 1990, la precipitación fue más variable, aumentando unos años y descendiendo en otros. En cambio, en Alchichica se ha mantenido

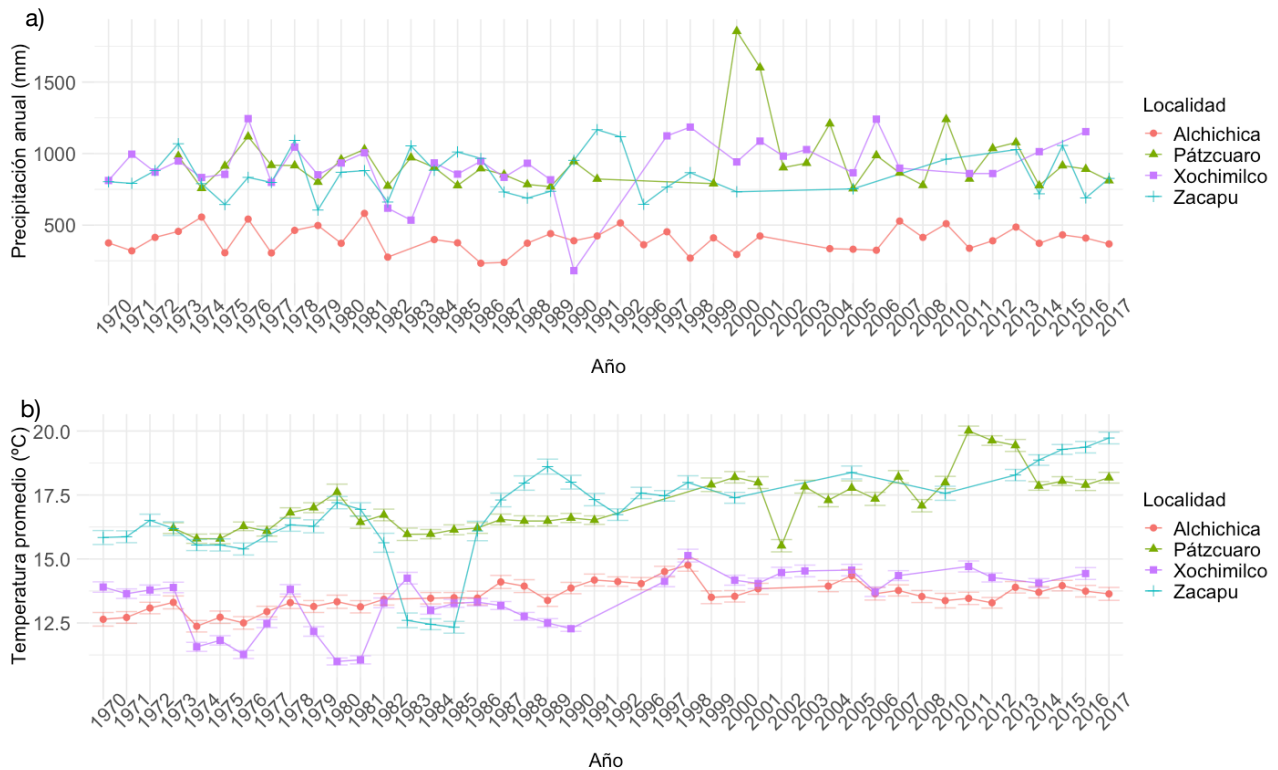


Figura 3. Datos de precipitación y temperatura en los diferentes sitios de 1970-2017

a) Precipitación anual en milímetros b) Temperatura promedio en grados centígrados. Las barras de error representan el error estándar. Debido a que los registros no estaban completos en las bases de datos del SIH, se dejaron los años para los cuales 2 o más sitios tenían un mínimo de 300 registros.

en un rango de 300-500 mm desde 1970 hasta el 2017. Comparando los valores de precipitación anual se determinó que Alchichica presenta diferencias significativas con respecto a los otros tres sitios (Tabla 2).

Tabla 2. Comparaciones estadísticas de parámetros bioclimáticos			
Parámetro	Comparación	P-valor	Significancia
Precipitación	Alchichica-Patzcuaro	2.0E-13	****
	Alchichica-Zacapu	6.2E-13	****
	Alchichica-Xochimilco	1.5E-11	****
	Patzcuaro-Zacapu	0.18	ns
	Patzcuaro-Xochimilco	0.46	ns
	Zacapu-Xochimilco	0.18	ns
Temperatura	Alchichica-Patzcuaro	4.9E-22	****
	Alchichica-Zacapu	3.5E-11	****
	Alchichica-Xochimilco	1	ns
	Patzcuaro-Zacapu	1	ns
	Patzcuaro-Xochimilco	4.8E-20	****
	Zacapu-Xochimilco	2.9E-11	****

En cuanto a la temperatura anual se observó que cada sitio ha experimentado diferentes cambios de temperatura a lo largo de los años (Fig. 3b). En Zacapu la temperatura osciló entre 12.5-17.5 °C de 1970 a 1985; posteriormente ocurrieron aumentos año tras año. En Pátzcuaro la temperatura osciló entre 15-17.5 °C, pero a partir de 1999 se reportaron temperaturas más altas. A diferencia de estos dos sitios, en Xochimilco y Alchichica la temperatura osciló entre 12.5-15 °C la mayoría de los años. Comparando los valores de temperatura promedio se determinó que Alchichica y Xochimilco presentan diferencias significativas con Pátzcuaro y Zacapu (Tabla 2).

Con el propósito de identificar alteraciones en los parámetros climáticos, se calcularon y representaron las anomalías de precipitación y temperatura. Éstas son definidas como desviaciones positivas o negativas del promedio a largo plazo de alguna medida (e.j precipitación, temperatura) sobre determinada región en un periodo de tiempo (National Weather Service Glossary, 2021).

En el caso de la precipitación, se observó que en Zacapu la mayoría de las anomalías durante los años 70's y 80's fueron positivas y ocurrieron dentro de la temporada de lluvias, reportada de mayo a noviembre (Fig. 4a). Sin embargo, a partir de los 90's, las anomalías negativas

aumentaron. En Pátzcuaro, las anomalías positivas y negativas ocurrieron en los mismos meses durante los 70's y 80's mientras que en las décadas posteriores este patrón cambió (Fig. 4b). En Xochimilco y Alchichica, dominaron las anomalías positivas durante los años 70's y 80's mientras que en las décadas posteriores predominaron las negativas (Fig. 4c y 4d). Por lo que se refiere a la temperatura (Fig. 5a-d), se observó en todas las localidades que las anomalías fueron negativas en los años 70's y 80's, y positivas para el resto de las décadas.

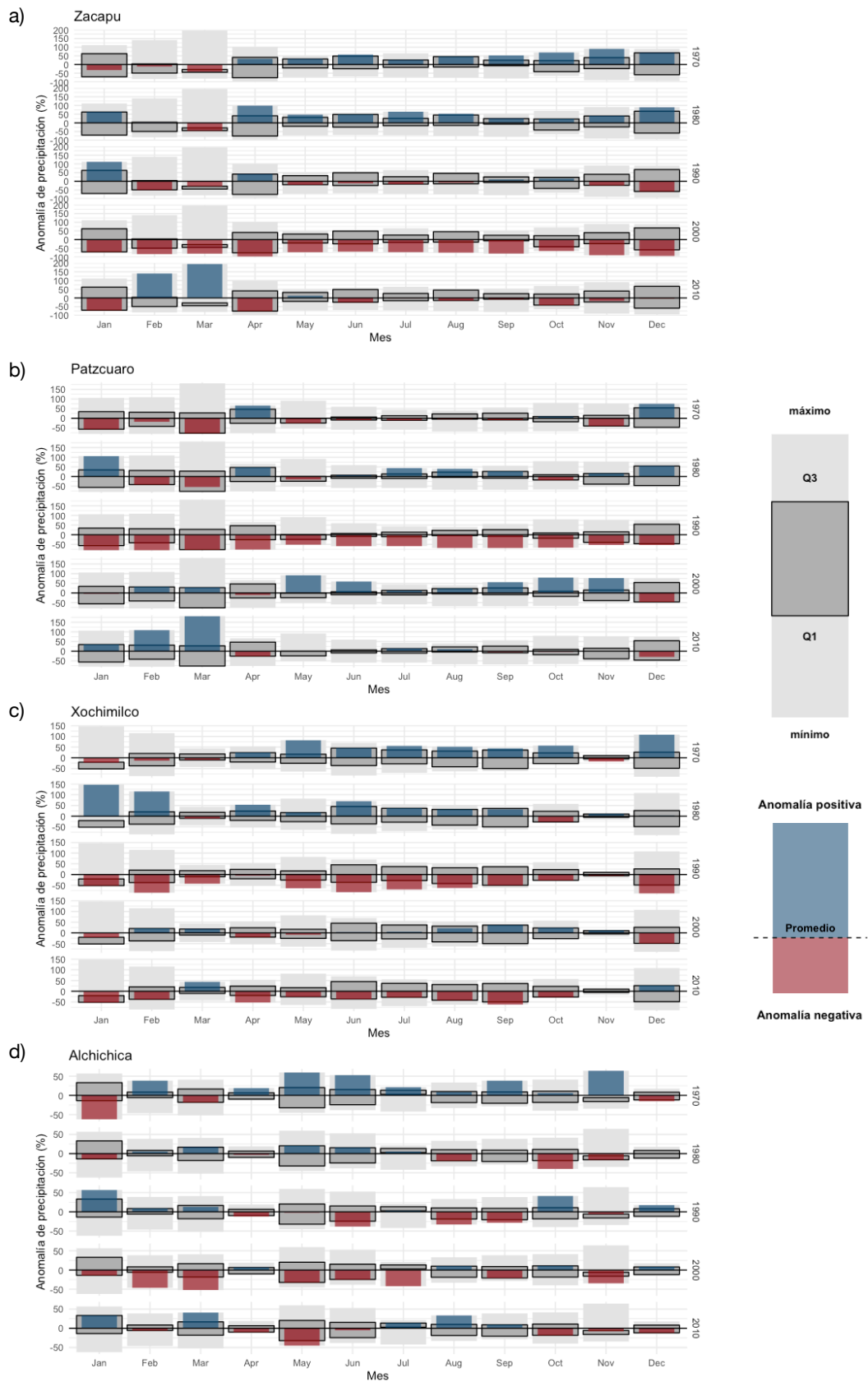


Figura 4. Anomalías de precipitación en las diferentes regiones en 1970's, 1980's, 1990's, 2000's y 2010's
 Anomalías de precipitación en a) Zacapu, b) Pátzcuaro, c) Xochimilco y d) Alchichica. En el eje de las x se representa el mes en orden de enero-diciembre y en el eje de las y se representa el porcentaje de anomalía. Cada panel cuenta con 5 gráficos, donde cada uno representa una década distinta.

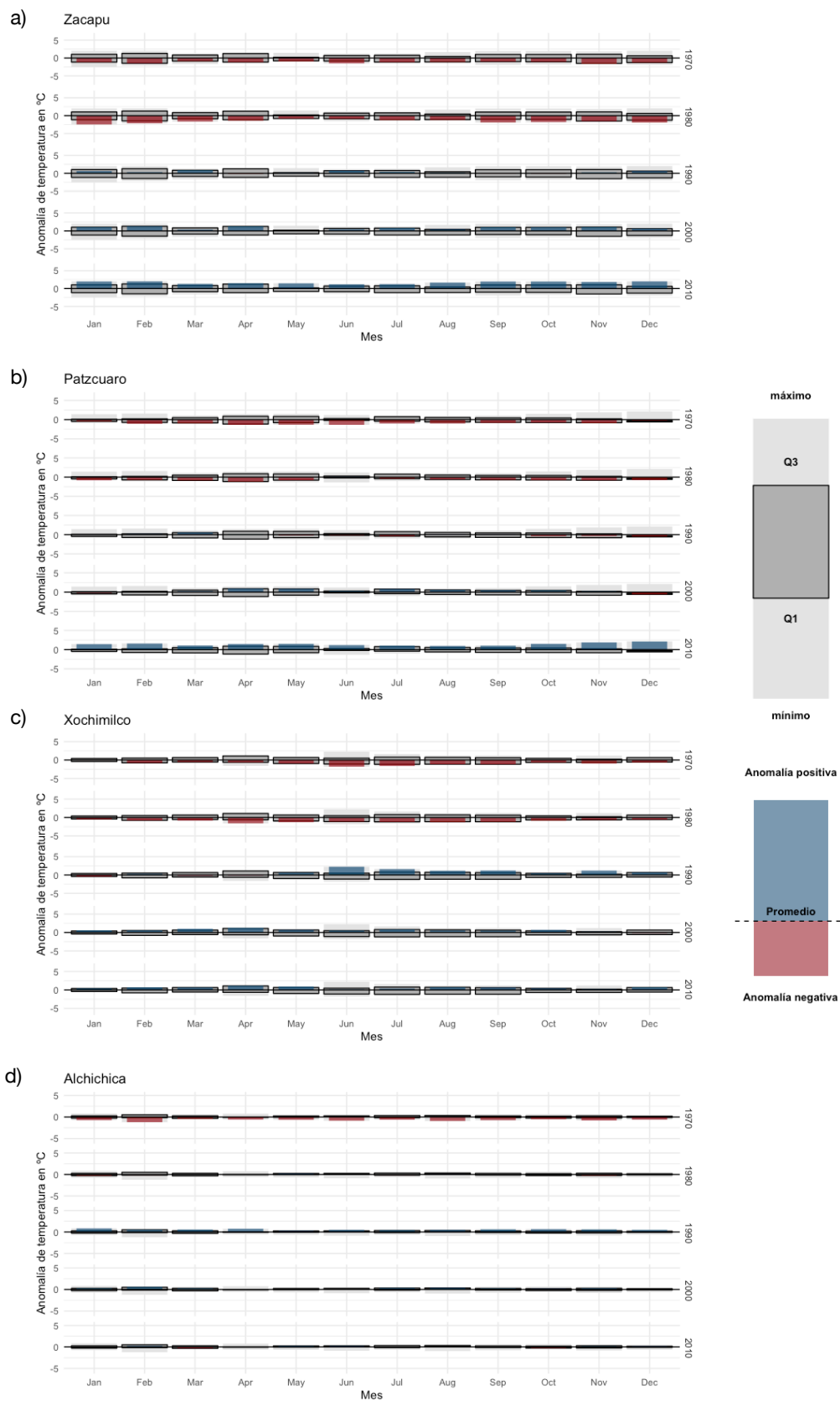


Figura 5. Anomalías de temperatura en las diferentes regiones en 1970's, 1980's, 1990's, 2000's y 2010's
 Anomalías de temperatura en a) Zacapu, b) Pátzcuaro, c) Xochimilco y d) Alchichica. En el eje de las x se representa el mes en orden de enero-diciembre y en el eje de las y se representa la anomalía en °C. Cada panel cuenta con 5 gráficos, donde cada uno representa una década distinta.

Una vez descritos los promedios anuales de precipitación y temperatura, así como las anomalías positivas o negativas entre décadas, se analizaron los patrones y tendencias (temporales y cíclicas) para cada uno de los factores a lo largo del tiempo mediante gráficos estacionales (seasonal plots).

Para el caso de la precipitación anual se observó que durante los 70's (color azul) y 80's (color naranja) la temporada de precipitación ocurrió principalmente entre junio-octubre para todos los sitios (Fig. 6a-d). Sin embargo, en los 90's (color morado) esto cambió, con excepción de Alchichica que mantenía la precipitación en los mismos meses (Fig. 6d). Durante esta década en Zacapu la temporada de lluvias ocurrió principalmente de mayo-agosto; en Pátzcuaro, de abril-julio y en Xochimilco de marzo-julio. En los 2000's (color rosa) y 2010's (color verde), la temporada de precipitación ocurrió de febrero-septiembre en Zacapu, de diciembre-marzo en Pátzcuaro, de octubre-mayo en Xochimilco y de febrero-agosto en Alchichica. Adicionalmente, se identificaron los meses en los que ha ocurrido mayor precipitación, independientemente de la década. En Zacapu, la máxima de precipitación se alcanzó en julio (Fig. 6e); en Pátzcuaro, en julio (Fig. 6f); en Xochimilco, no se observó un mes en particular pues la precipitación fue constante a lo largo del año (Fig. 6g) mientras que en Alchichica el máximo ocurrió en julio (Fig. 6h).

Con respecto a la temperatura, se observó que en Zacapu el patrón de corrimiento no se modificó a lo largo del tiempo (Fig. 7a). En cambio, en Pátzcuaro durante los 70's, 80's y 90's las temperaturas más altas se registraron de marzo-septiembre; posteriormente, se registraron de octubre-enero (Fig. 7b). En Xochimilco, las temperaturas más altas ocurrieron entre marzo y septiembre en los 70's y 80's mientras que en los 90's fueron de enero-marzo, en los 2000's de octubre-enero y en los 2010's de agosto-diciembre (Fig. 7c). En Alchichica, el patrón de corrimiento no se modificó a lo largo del tiempo (Fig. 7d). Se observó que las temperaturas más altas se registraban en marzo para Zacapu (Fig. 7e), en marzo y abril para Pátzcuaro (Fig. 7f) y Xochimilco (Fig. 7g) y en mayo para Alchichica (Fig. 7h).

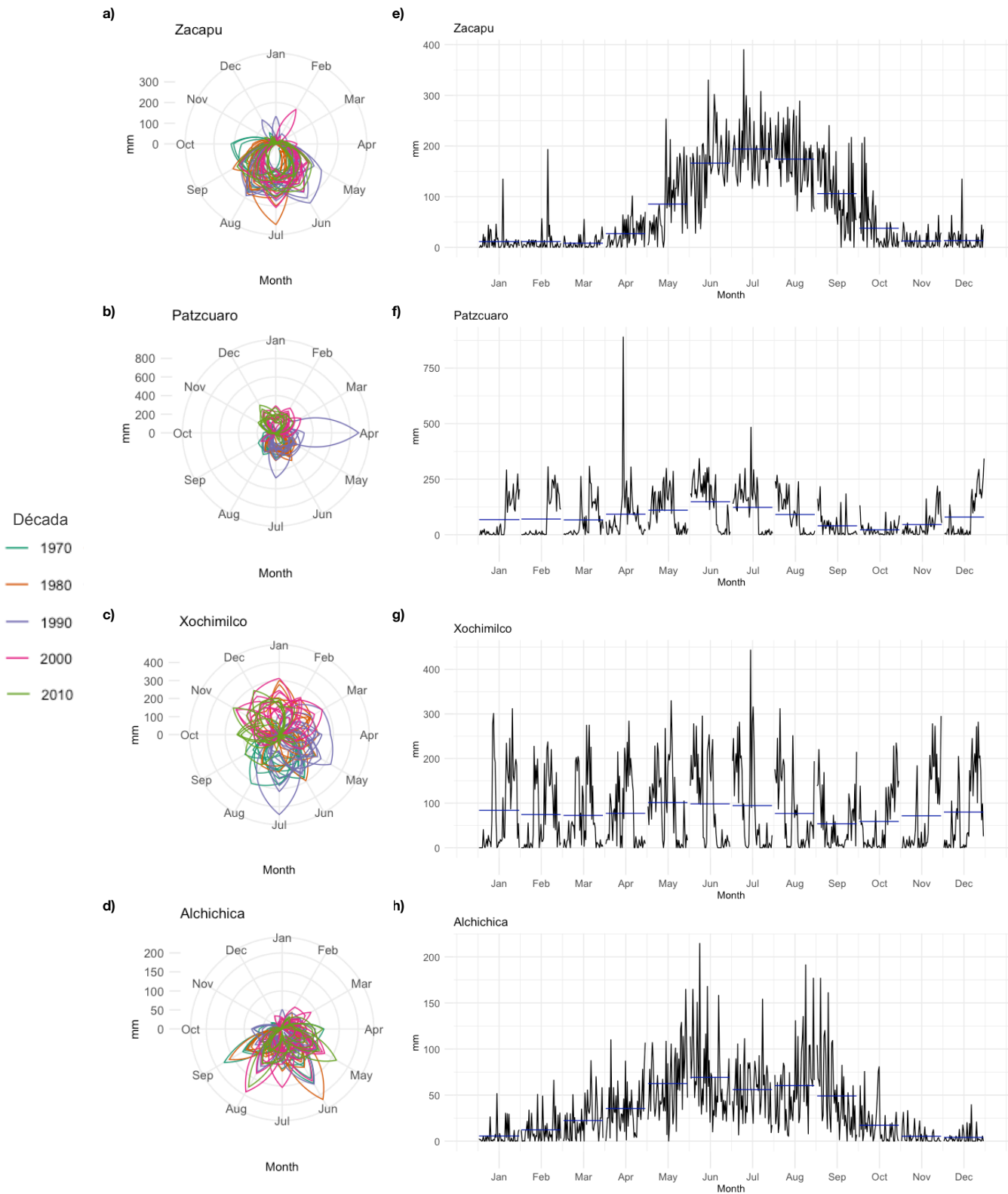


Figura 6. Gráficos estacionales de la precipitación ocurrida de 1970-2017 para las diferentes regiones
 Los paneles a-d representan la cantidad de precipitación anual (mm), ocurrida en cada sitio. El aumento se refleja en que tan lejos se encuentra del centro. Cada mes representa un ángulo diferente mientras que las décadas son representadas por un color distinto. Las figuras e-h representan la cantidad mensual de precipitación. Cada línea negra representa un año distinto mientras que la línea azul refleja el promedio.

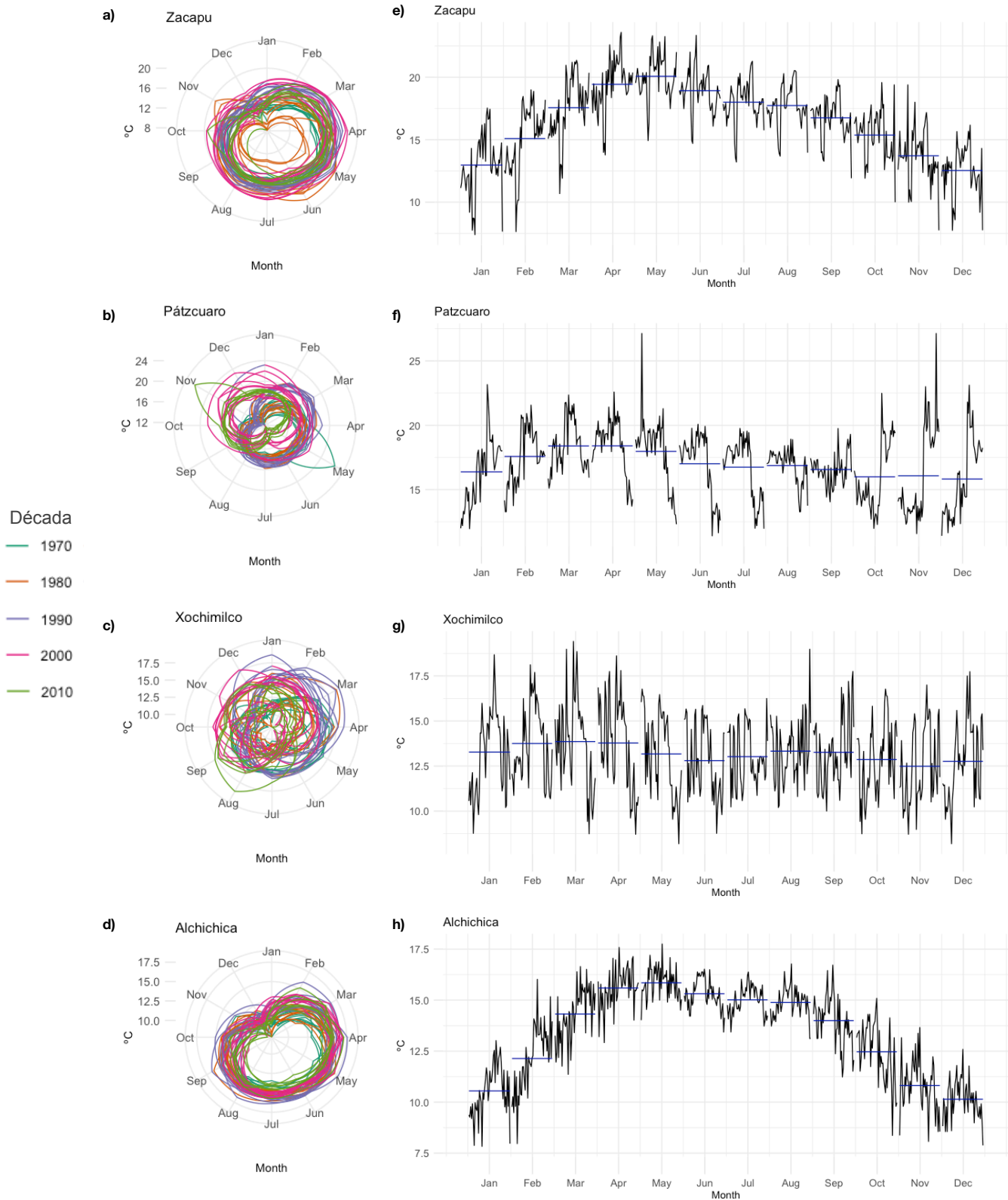


Figura 7. Gráficos estacionales de la temperatura registrada de 1970-2017 para las diferentes regiones
 Los paneles a-d representan la cantidad de temperatura ($^{\circ}\text{C}$) registrada en cada sitio. El aumento se refleja en que tan lejos se encuentra del centro. Cada mes representa un ángulo diferente mientras que los años son representados por un color distinto. Las figuras e-h representan la cantidad mensual de temperatura registrada. Cada línea negra representa un año mientras que la línea azul refleja el promedio.

1.2 Cada laguna se distingue en su composición fisicoquímica

Con la finalidad de caracterizar las condiciones del hábitat en donde viven las diferentes especies, se analizaron los parámetros fisicoquímicos (pH, temperatura, oxígeno disuelto y conductividad) de cada localidad, los cuales fueron medidos al momento del muestreo.

Se observó que el pH fue alcalino para todas las lagunas con un promedio entre 8.7-9.5 (Fig. 8a). Se observaron diferencias significativas de Zacapu con Alchichica y Pátzcuaro y entre Alchichica y Pátzcuaro (Fig. 8a y Anexo 2). La temperatura promedio observada osciló entre los 18-22 °C (Fig. 8b), observándose diferencias significativas entre Alchichica-Zacapu, Alchichica-Xochimilco, Pátzcuaro-Zacapu y Pátzcuaro-Xochimilco (Fig. 8a y Anexo 2). Con respecto al oxígeno disuelto, Zacapu presentó en promedio una mayor cantidad de oxígeno disuelto (14 ppm) comparada con los valores registrados en los otros sitios, los cuales iban de 3-8 ppm (Fig. 8c). La laguna de Alchichica y Zacapu tuvieron diferencias significativas con las otras lagunas (Anexo 2). La conductividad promedio fue desde 100 $\mu\text{S}/\text{cm}$ hasta 2000 $\mu\text{S}/\text{cm}$, observándose diferencias significativas entre todos los sitios (Fig. 8d).

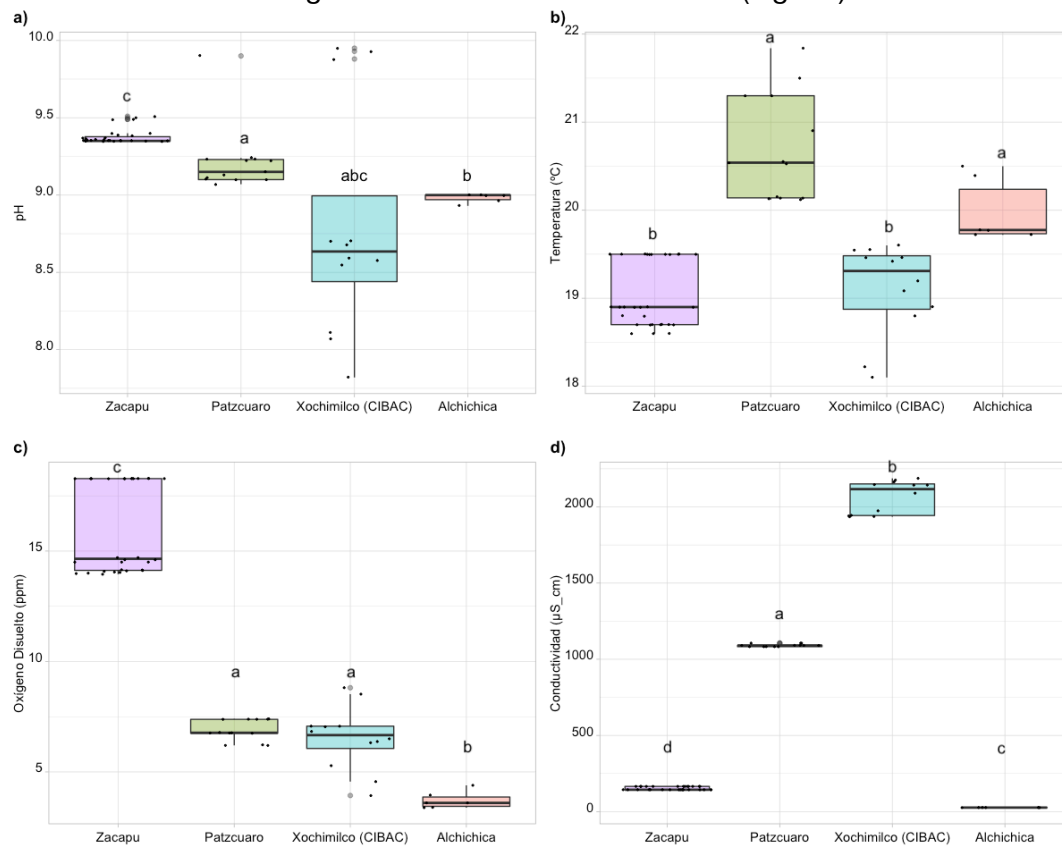


Figura 8. Parámetros fisicoquímicos de las lagunas y mesocosmos

a) pH registrado al momento del muestreo b) Temperatura del agua (°C) de cada sitio registrada al momento del muestreo c) Oxígeno disuelto (ppm) registrado al momento del muestreo y d) Conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$) registrada al momento del muestreo. En el eje de las x se encuentran los sitios donde habitan las especies de ajolotes ocupadas acomodadas por su ubicación geográfica de oeste a este.

Con el propósito de identificar si existían similitudes entre los diferentes sitios, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) ocupando los cuatro parámetros fisicoquímicos analizados junto con la precipitación anual y temperatura promedio reportada de 1990-2017. Si bien se tenían datos desde 1970, se decidió ocupar únicamente aquellos que van a partir de 1990, pues es a partir de este año que se observó un cambio en los patrones de precipitación y temperatura (Fig. 3-7). A partir del PCA se observó que los datos de cada localidad se agrupan entre sí y difieren con las otras localidades (Fig. 9). Los dos primeros ejes del PCA explicaron el 56.26% de la varianza, la cual en el primer eje estuvo explicada por las diferencias en el oxígeno disuelto, la conductividad, pH y la temperatura promedio de 1990-2017 mientras que para el segundo fueron las diferencias en la precipitación de 1990-2017 (Anexo 3).

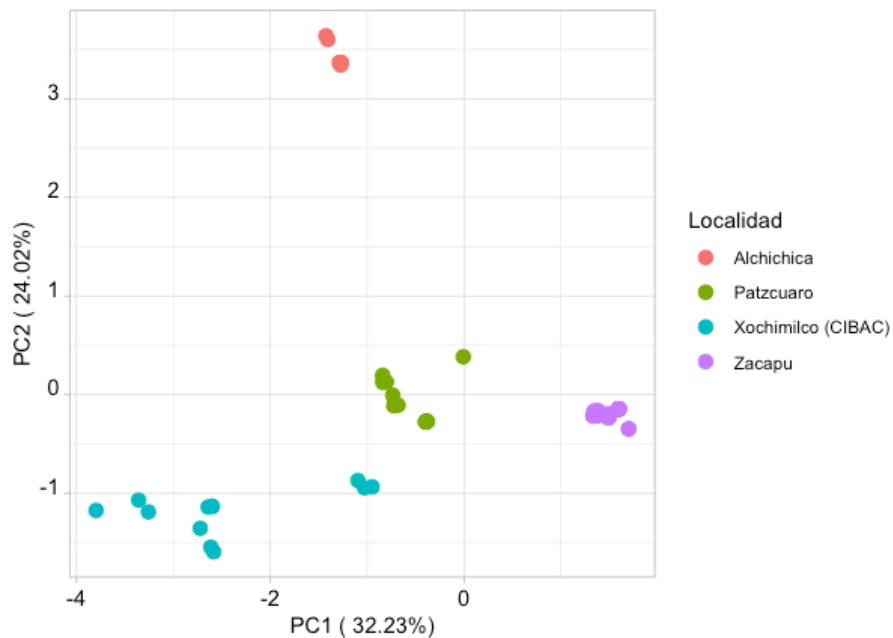


Figura 9. Análisis de componentes principales (PCA) realizado con los parámetros fisicoquímicos y climáticos (precipitación y temperatura media de 1990-2017)

Este PCA se realizó ocupando las mediciones fisicoquímicas tomadas en el muestreo y los datos bioclimáticos analizados de 1990-2017. Los datos climáticos previos a 1990 fueron descartados debido a que es a partir de este año que se observaron variaciones. La varianza del PC1 estuvo explicada por las diferencias en el oxígeno disuelto, el pH, la conductividad y la temperatura media de 1990-2017 mientras que para el PC2 fueron las diferencias en la precipitación media de 1990-2017. Cada color representa una localidad distinta.

Capítulo 2. Composición y estructura de la comunidad microbiana de ajolotes pedomórficos obligados

2.1 Diversidad alfa y beta

Para investigar la diversidad que se encuentra en la piel de las distintas especies de ajolotes pedomórficos obligados analizados en este estudio, se analizó un total de 91 muestras de microbioma para la secuenciación de 16S y 81 muestras para la secuenciación de ITS. Este total de muestras representan a aquellas que pasaron el corte de rarefacción (Anexo 1).

Con respecto a la diversidad alfa bacteriana, esta fue significativamente distinta entre especies de acuerdo al número de ASVs observados (Kruskal-Wallis (KW), $\chi^2 = 45.233$, p-valor < 0.001), el índice de Shannon (KW, $\chi^2 = 40.37$, p-valor < 0.001) y la diversidad de Fade (KW, $\chi^2 = 45.179$, p-valor < 0.001). Al realizar las comparaciones pareadas *post hoc* para cada índice se observó que la diversidad alfa de *A. andersoni* y *A. dumerilii*, ambas especies ubicadas en Michoacán, fue significativamente mayor a la observada en *A. mexicanum* y *A. taylori* (Fig. 10a-c). De manera similar, la diversidad alfa fúngica fue significativamente distinta entre especies para el número de ASVs observados (KW, $\chi^2 = 34.367$, p-valor < 0.001) y el índice de Shannon (KW, $\chi^2 = 18.438$, p-valor < 0.001). La diversidad alfa de acuerdo al número de ASVs observados de *A. taylori* fue significativamente diferente a la del resto (Fig. 10d) mientras que bajo el índice de Shannon, esta solo fue significativamente diferente a la de *A. andersoni* y *A. mexicanum* (Fig. 10e).

En cuanto a la diversidad beta, las comunidades bacterianas de *A. andersoni* y *A. dumerilii* fueron más similares entre sí, mostrando un patrón de agrupación en el análisis de coordenadas principales (PCoA), tanto en términos de abundancia (índice de Bray-Curtis) como de presencia/ausencia (índice de Jaccard). En el caso de *A. mexicanum* y *A. taylori*, si bien la abundancia de la comunidad de bacterias es similar (Fig. 11a), la presencia/ausencia de éstas difiere (Fig. 11b). La varianza explicada en Bray-Curtis fue del 36.3% mientras que en Jaccard fue del 21.6%. Al realizar el análisis de varianza por PERMANOVA de ambos índices se observó que las comunidades bacterianas difieren significativamente (Bray-Curtis PERMANOVA, pseudo-F = 16.548, p-valor = 0.001 y Jaccard PERMANOVA, pseudo-F = 8.0142, p-valor = 0.001). Adicionalmente, se analizó la diversidad beta ocupando las métricas de Unifrac ponderado y no ponderado. En el Unifrac ponderado se observó que las comunidades bacterianas de *A. andersoni*, *A. dumerilii* y *A. mexicanum* fueron similares entre sí (Fig. 11c) mientras que en el Unifrac no ponderado solo las comunidades de *A. andersoni* y

A. dumerilii fueron similares (Fig. 11d). La varianza explicada en Unifrac ponderado fue del 35.3% mientras que en Unifrac no ponderado fue del 15.7%. Al realizar el análisis de varianza por PERMANOVA de estos dos índices se observó que las comunidades bacterianas difieren significativamente (Unifrac ponderado PERMANOVA, pseudo-F = 13.79, p-valor = 0.001 y Unifrac no ponderado PERMANOVA, pseudo-F = 7.0631, p-valor = 0.001).

Igualmente, las comunidades de hongos de *A. andersoni* y *A. dumerilii* fueron similares entre sí en términos de abundancia (Fig. 11e) y presencia/ausencia (Fig. 11f). Asimismo, *A. mexicanum* y *A. taylori* presentaron similitudes en la abundancia de sus comunidades (Fig. 11e), pero estas difieren en términos de presencia/ausencia (Fig. 11f). La varianza explicada en Bray-Curtis fue del 18% mientras que en Jaccard fue del 12.6%. El análisis de varianza por PERMANOVA de ambos índices mostró que las comunidades de hongos difieren significativamente (Bray-Curtis PERMANOVA, pseudo-F = 5.6344, p-valor = 0.001 y Jaccard PERMANOVA, pseudo-F = 3.8168, p-valor = 0.001).

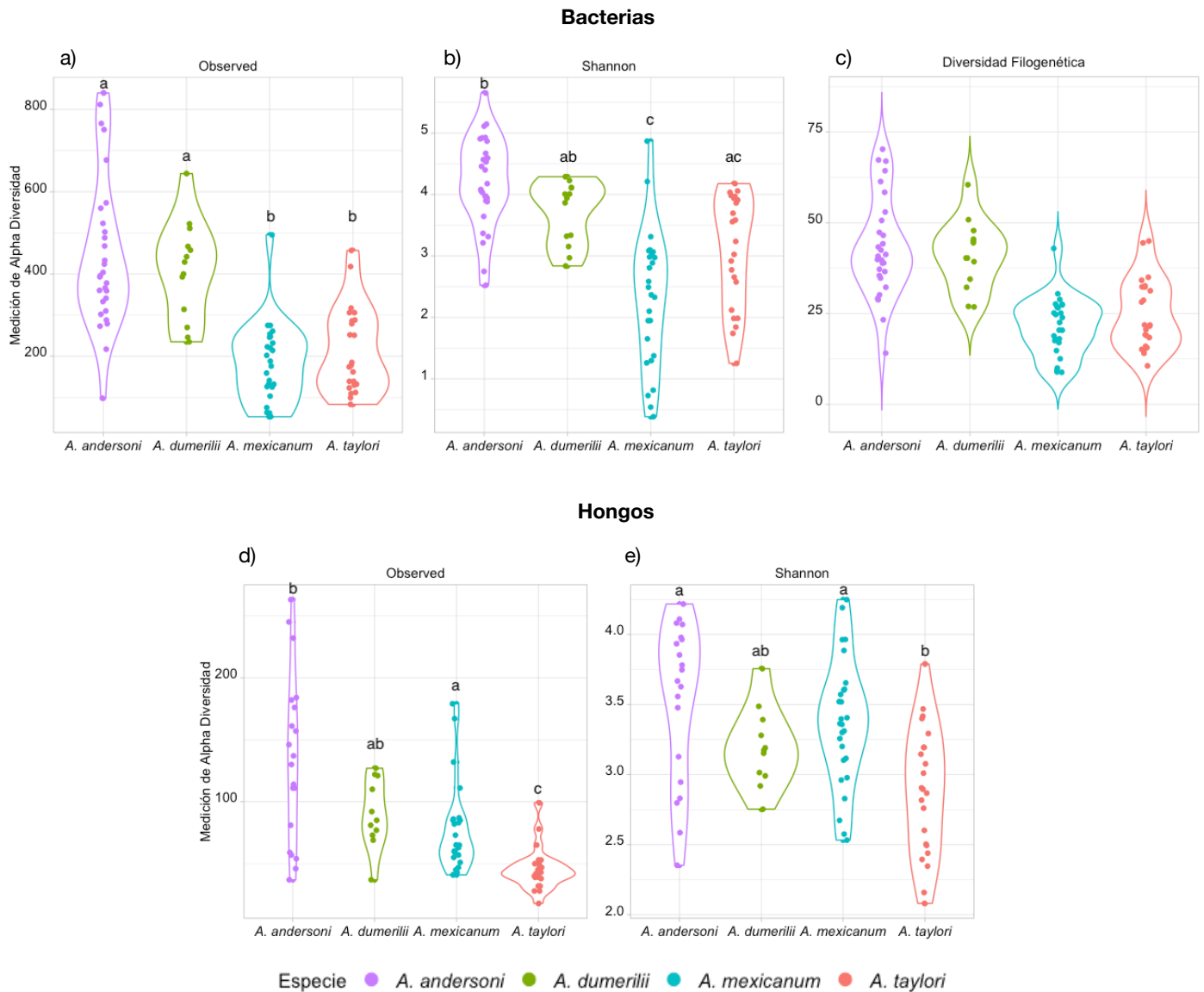


Figura 10. Diversidad alfa de la comunidad bacteriana y de hongos presente en las cuatro especies de ajolotes pedomórficos obligados

Diversidad alfa de las secuencias 16S basada en a) el número de ASVs observados y b) el índice de Shannon. c) Cuantificación de la diversidad filogenética de las secuencias 16S. Diversidad alfa de las secuencias ITS basada en d) el número de ASVs observados y e) el índice de Shannon. En el eje x se muestra a la especie de *Ambystoma* correspondiente, estas están acomodadas de acuerdo a su locación geográfica en dirección oeste a este.

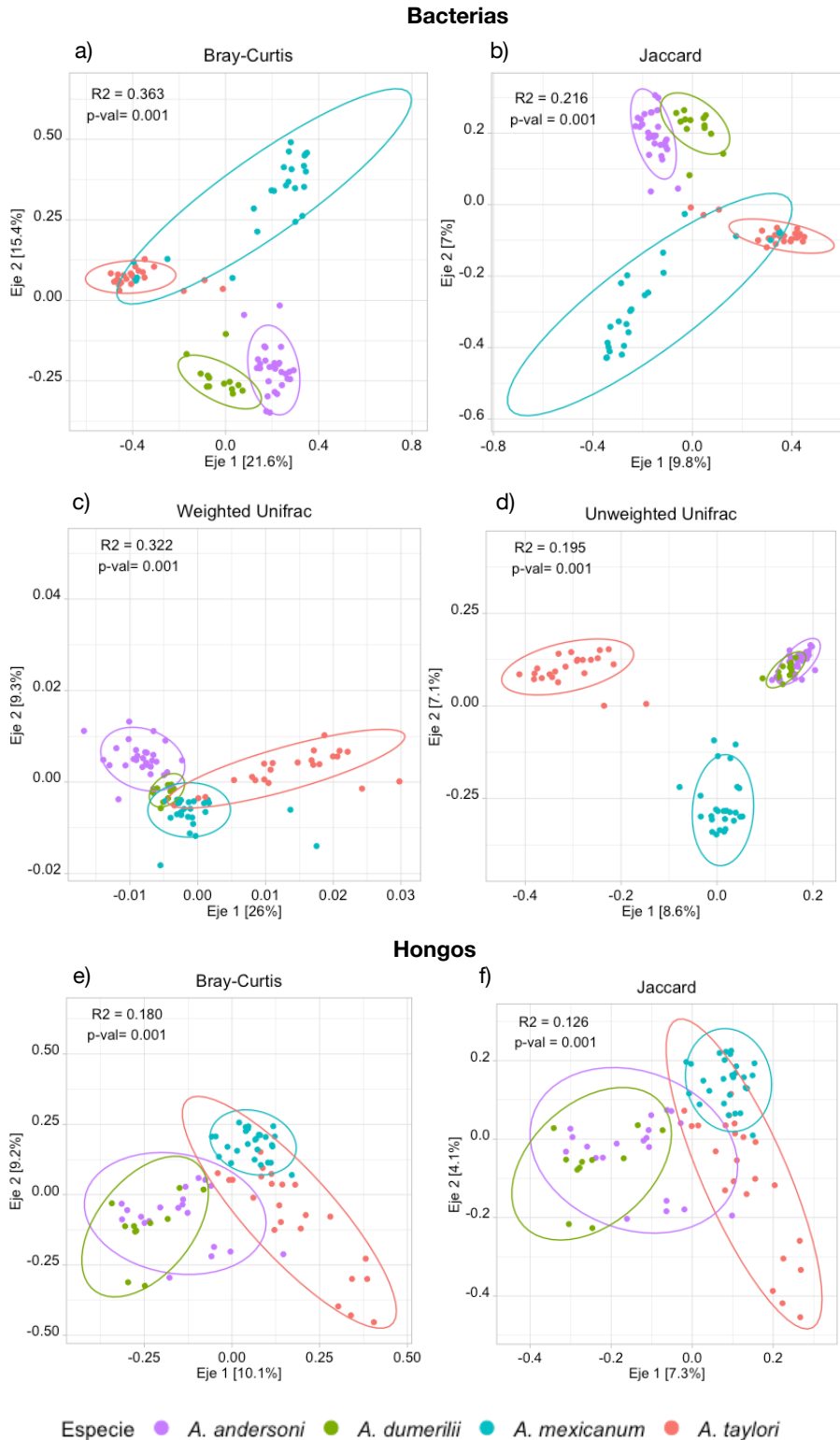


Figura 11. Diversidad beta de la comunidad bacteriana y de hongos presente en las cuatro especies de ajolotes pedomórficos obligados

PCoA de la diversidad beta de las secuencias 16S, la cual fue calculada con a) el índice de Bray-Curtis, b) el índice de Jaccard, c) el índice de Unifrac ponderado y d) Unifrac no ponderado. En el caso de la diversidad beta de las secuencias ITS, esta únicamente fue calculada con d) el índice de Bray-Curtis y e) el índice de Jaccard. En la esquina superior izquierda se encuentra el valor de r^2 y el p-valor obtenido a partir del análisis estadístico del PCoA.

2.2 Composición taxonómica de la microbiota

Con el objetivo de conocer la composición de la microbiota de los ajolotes pedomórficos obligados, se identificaron a las clases de bacterias y hongos que estaban presentes en la microbiota de la piel de cada especie, agrupando a aquellas que tuvieran una abundancia relativa menor al 0.1% en una sola categoría. En las cuatro especies la clase *Gammaproteobacteria* se encontró en una abundancia mayor comparada con el resto; sin embargo, *Bacteroidia*, *Alphaproteobacteria* y *Verrucomicrobiae* fueron otras clases igualmente abundantes (Fig. 12a). En el caso de la comunidad de hongos, la clase *Dothideomycetes* se encontró en una abundancia mayor, seguida de *Eurotiomycetes*, *Tremellomycetes* y *Agariomycetes* (Fig. 12b).

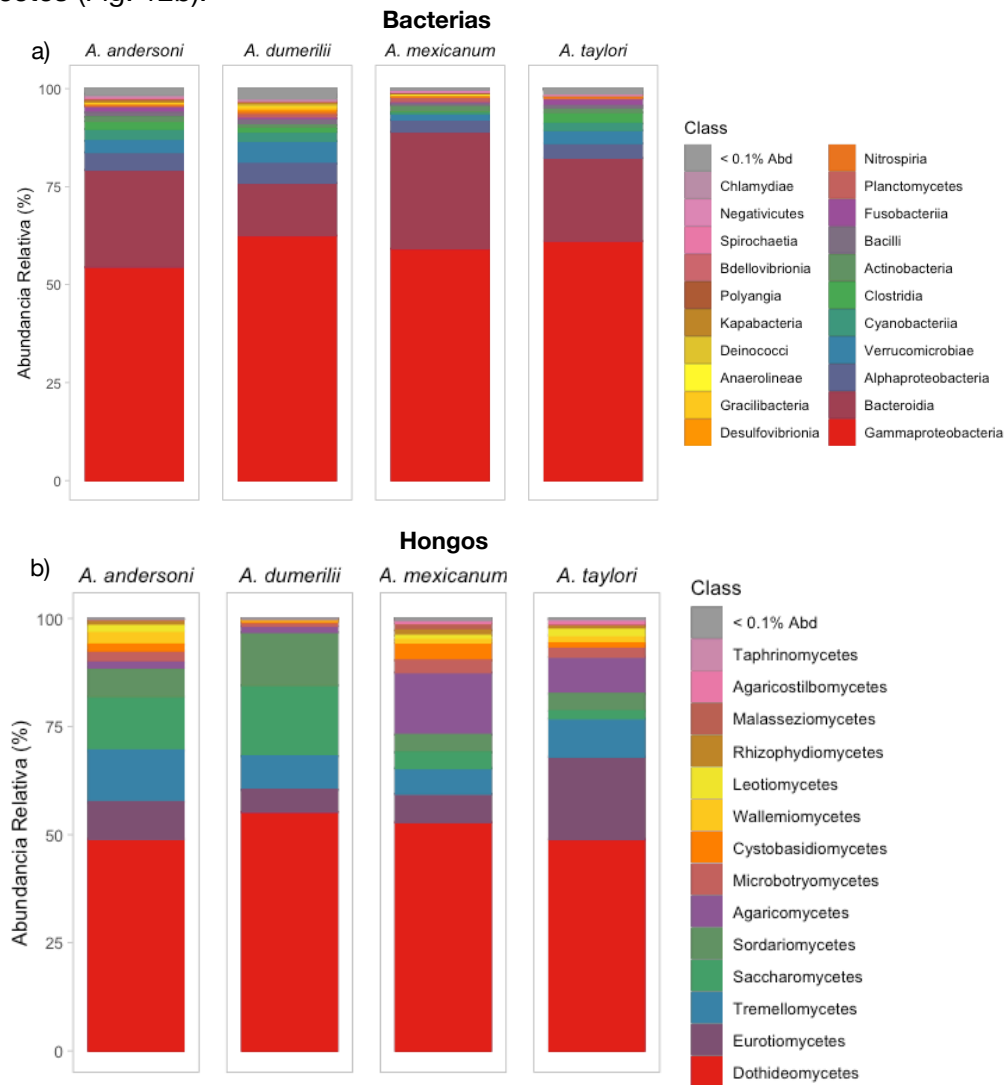


Figura 12. Composición taxonómica de las comunidades de bacterias y hongos presentes en las especies estudiadas

Gráfico de barras apiladas de las clases de a) bacterias y b) hongos presentes en la piel de las diferentes especies. En el eje y se encuentra la abundancia relativa en porcentaje (%) de cada una de las clases encontradas. Las clases con una diversidad menor a 0.1% fueron agrupadas en una sola categoría. Cada panel muestra a una especie de *Ambystoma* distinta, estas están acomodadas acorde a su locación geográfica en dirección oeste a este.

Una vez analizada la composición de la comunidad microbiana a nivel de clase, se realizó el análisis del número de ASVs únicos de cada especie y de los compartidos entre ellas. Con respecto a la comunidad bacteriana (Fig. 13a), *A. andersoni* fue la especie que tuvo mayor número de ASVs únicos con 4724 ASVs, seguido de *A. dumerilii* con 1638 ASVs, *A. taylori* con 1630 ASVs y *A. mexicanum* con 1131 ASVs. Se encontraron 88 ASVs compartidos entre todas las especies, los cuales pertenecieron a 8 clases y 20 órdenes distintos (Fig. 13b), siendo el orden *Burkholderiales*, perteneciente a la clase *Gammaproteobacteria*, el más abundante en las cuatro especies. El resto de los órdenes se encontraron presentes en una abundancia relativa menor o igual al 20% (Fig. 13b).

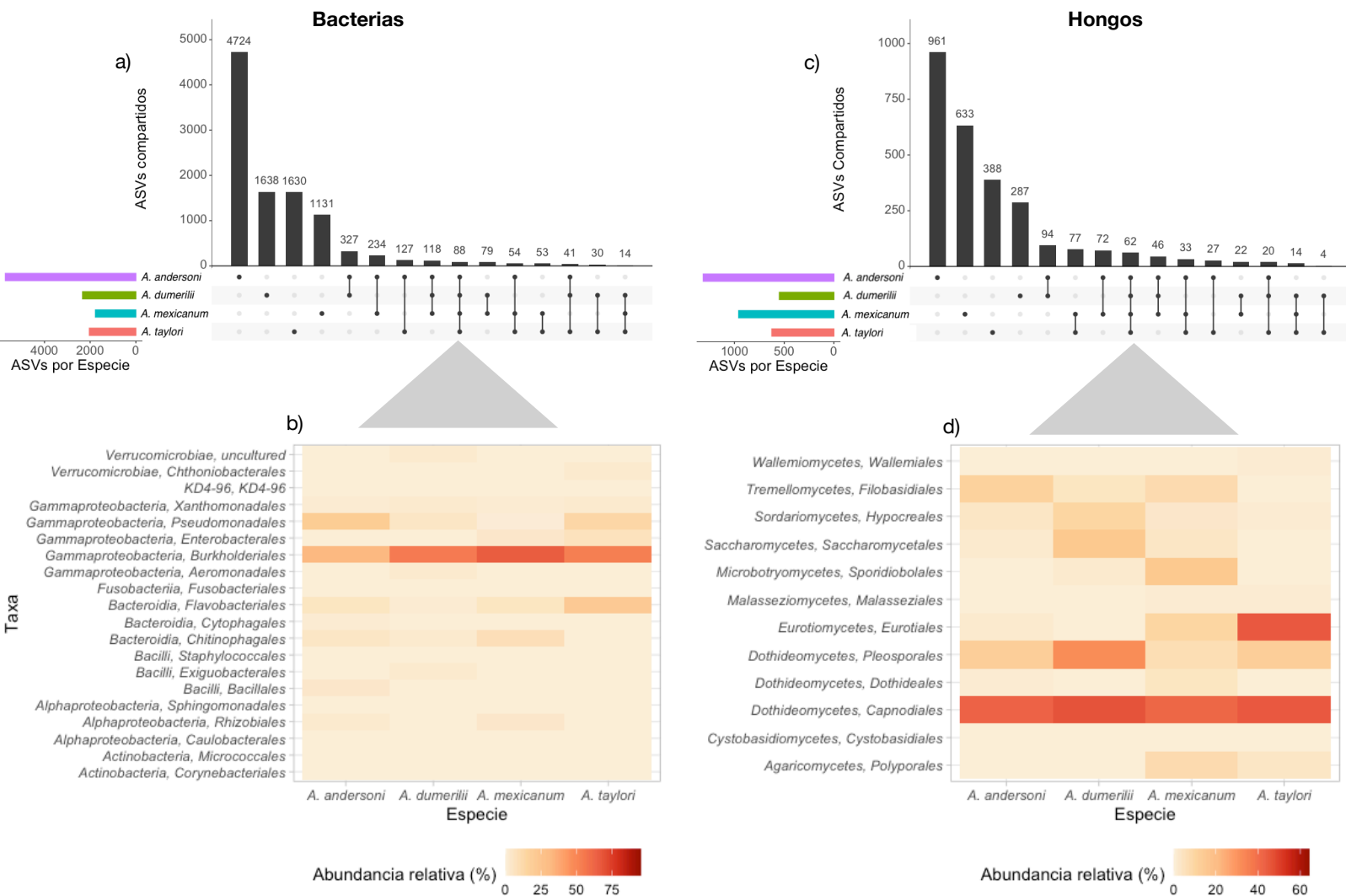


Figura 13. ASVs únicos de cada especie y compartidos

Upset plot de los ASVs únicos y compartidos entre especies de las secuencias a) 16S e b) ITS. Este mismo gráfico presenta uno de barras en el cual se observa el número de ASVs totales por cada especie encontrados durante el procesamiento de las secuencias. Mapa de calor en el cual se representa a la clase y el orden c) bacteriano y d) fúngico al que corresponden los ASVs compartidos entre especies (eje y) y la abundancia relativa (%) de cada uno por especie (eje x).

En el caso de la comunidad de hongos (Fig. 13c), *A. andersoni* fue la especie que tuvo mayor número de ASVs únicos con 961 ASVs, seguido de *A. mexicanum* con 633 ASVs, *A. taylori* con 388 ASVs y *A. dumerilii* con 287 ASVs. Entre todas las especies se compartieron 62 ASVs, los cuales pertenecieron a 10 clases y 12 órdenes distintos, siendo el orden *Capnodiales*, perteneciente a la clase *Dothideomycetes*, el más abundante en las cuatro especies (Fig. 13d). El resto de los órdenes estaban presentes en una abundancia relativa del 20-40%.

Con el objetivo de identificar qué bacterias y hongos describen mejor a las especies de ajolotes pedomórficos obligados, se realizó un análisis de discriminante lineal por efecto de tamaño (LEfSe). Este análisis identifica a los grupos taxonómicos que se encuentran en una abundancia significativamente mayor en un grupo comparado con otros. El LEfSe de todas las especies mostró 53 clases de bacterias diferencialmente abundantes entre las 4 especies (Fig. 14a). La especie en la que más clases enriquecidas se encontraron fue *A. dumerilii* con 29 clases, seguida de *A. andersoni* con 19, *A. taylori* con 3 y por último, *A. mexicanum* con 2. En el caso de las comunidades de hongos, el LEfSe mostró únicamente 4 clases, de las cuales 2 se encontraron más enriquecidas en *A. mexicanum*, 1 en *A. dumerilii* y 1 en *A. taylori* (Fig. 14b).

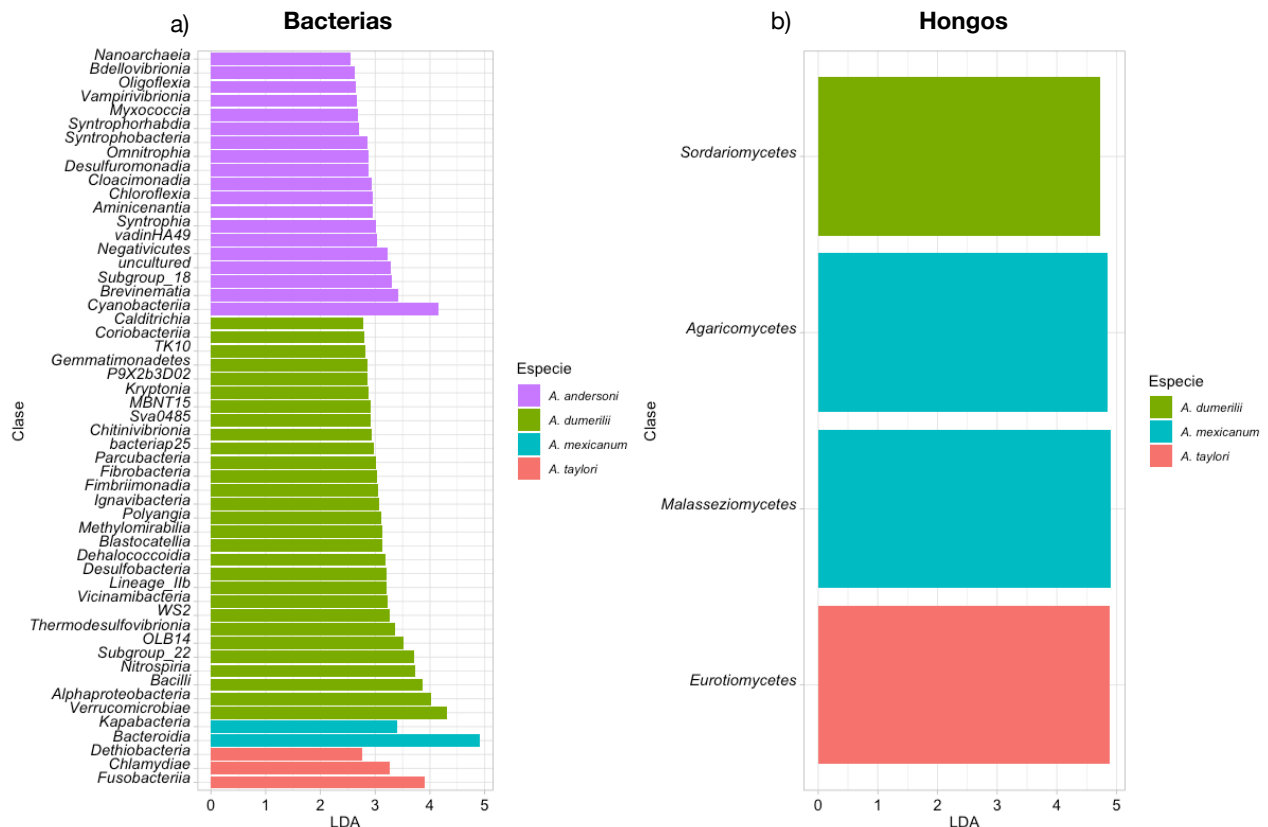


Figura 14. Bacterias y hongos diferencialmente abundantes entre las especies de ajolotes

LEfSe de todas las especies realizado a partir de la comunidad de a) bacterias y b) hongos. Cada barra horizontal representa a una clase distinta que resultó con un puntaje significativo; la longitud de esta representa el puntaje de LDA. Cada color es una especie de ajolote distinta.

Capítulo 3. Influencia del ambiente en la comunidad microbiana

Con el objetivo de analizar la influencia del ambiente en el microbioma de las distintas especies, se realizaron diferentes modelos simples de regresión lineal ocupando la diversidad alfa calculada con el índice de Shannon y los parámetros fisicoquímicos y climáticos (precipitación anual y temperatura promedio de 1990-2017). Se observó que el pH ($r^2 = 0.43$, p-valor = $1.05e-12$), el oxígeno disuelto ($r^2 = 0.12$, p-valor = $8.254e-07$) y la temperatura promedio de 1990-2017 ($r^2 = 0.33$, p-valor = $1.884e-09$) tuvieron una correlación positiva estadísticamente significativa con la diversidad alfa mientras que la conductividad tuvo una correlación negativa estadísticamente significativa ($r^2 = 0.24$, p-valor = $7.043e-07$) (Fig. 15a). En general, estos factores explicaron entre el 24-43% la varianza total observada en la diversidad.

En los modelos generados con la diversidad alfa de la comunidad de hongos se observó que el pH ($r^2 = 0.18$, p-valor = $5.112e-05$) y el oxígeno disuelto ($r^2 = 0.03$, p-valor = 0.07468) tuvieron una correlación positiva y significativa mientras que la conductividad ($r^2 = 0.21$, p-valor = $1.132e-05$) y la precipitación anual ($r^2 = 0.08$, p-valor = 0.009616) tuvieron una correlación negativa y significativa con la diversidad (Fig. 15b). Estos factores abióticos explicaron entre el 3-20% de la varianza total observada en la diversidad.

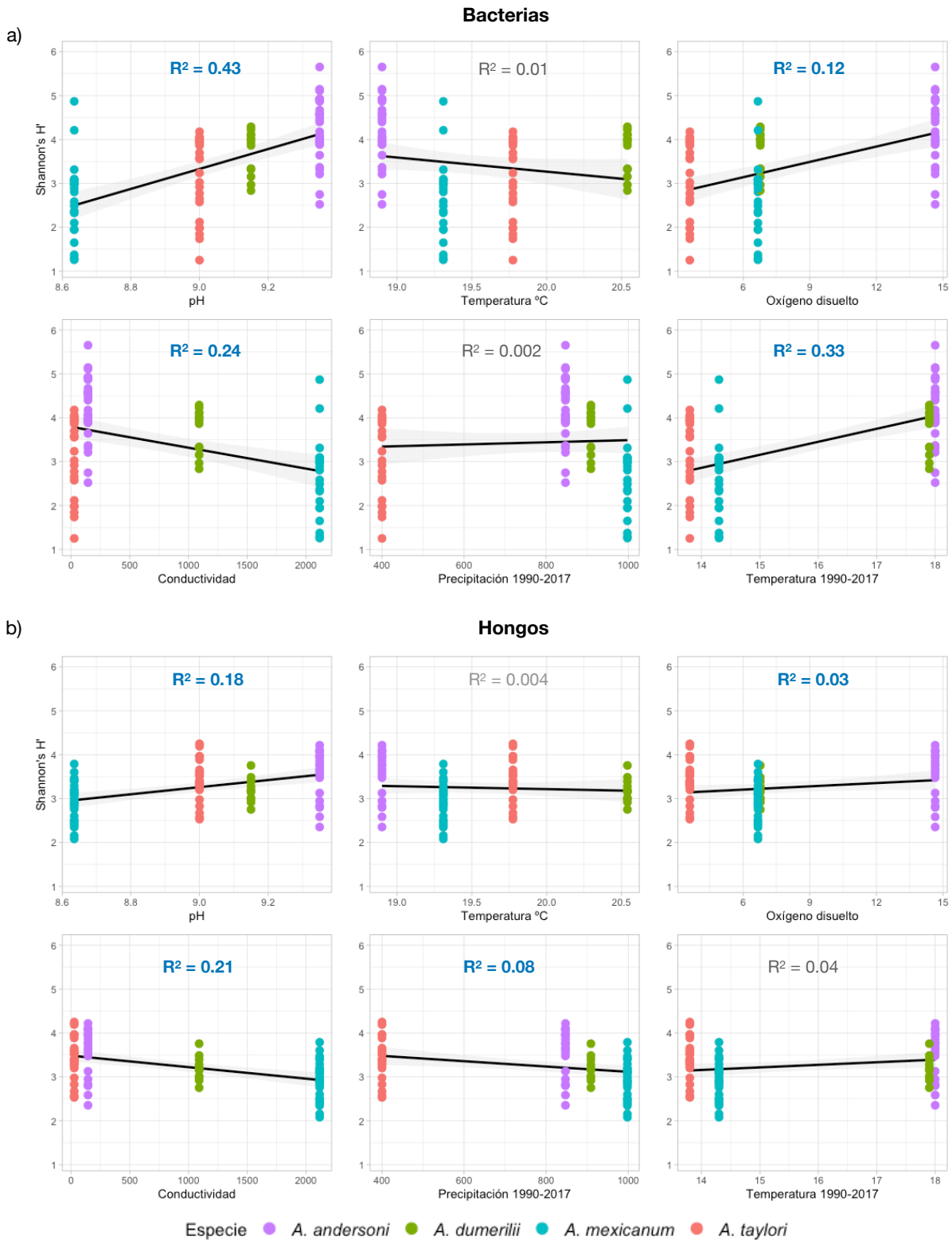


Figura 15. Correlación entre la diversidad alfa de las comunidades bacterianas y de hongos con los factores abióticos

Modelos de regresión lineal creados a partir de los factores abióticos y el índice de diversidad de Shannon de las secuencias de a) 16S e b) ITS. En la parte superior de cada regresión se encuentra el valor de la r^2 obtenido, aquellos en tono azul representan que la correlación resultó significativa.

Para determinar si los parámetros fisicoquímicos y climáticos tuvieron una influencia en la estructura de la comunidad bacteriana y de hongos (diversidad beta) presente en la piel de los distintos ajolotes, se realizó un análisis de redundancia basado en distancia (dbRDA). Se identificó que el oxígeno disuelto y el pH tuvieron un mayor peso, de acuerdo a la longitud del vector, en la ordenación de ambas comunidades (Fig. 16a y 16b). Es notable que las comunidades bacterianas de *A. andersoni* y *A. dumerilii* estaban asociadas positivamente con el oxígeno disuelto mientras que *A. mexicanum* y *A. taylori* estuvieron asociadas positivamente con el pH y la temperatura, respectivamente. La varianza total explicada por los primeros dos ejes fue del 80.5%. En el caso de las comunidades de hongos, las presentes en *A. andersoni* y *A. dumerilii* estuvieron asociadas positivamente con el oxígeno disuelto, pH y temperatura mientras que las de *A. mexicanum* y *A. taylori* se asociaron negativamente. La varianza total explicada por los primeros dos ejes fue del 79.7%.

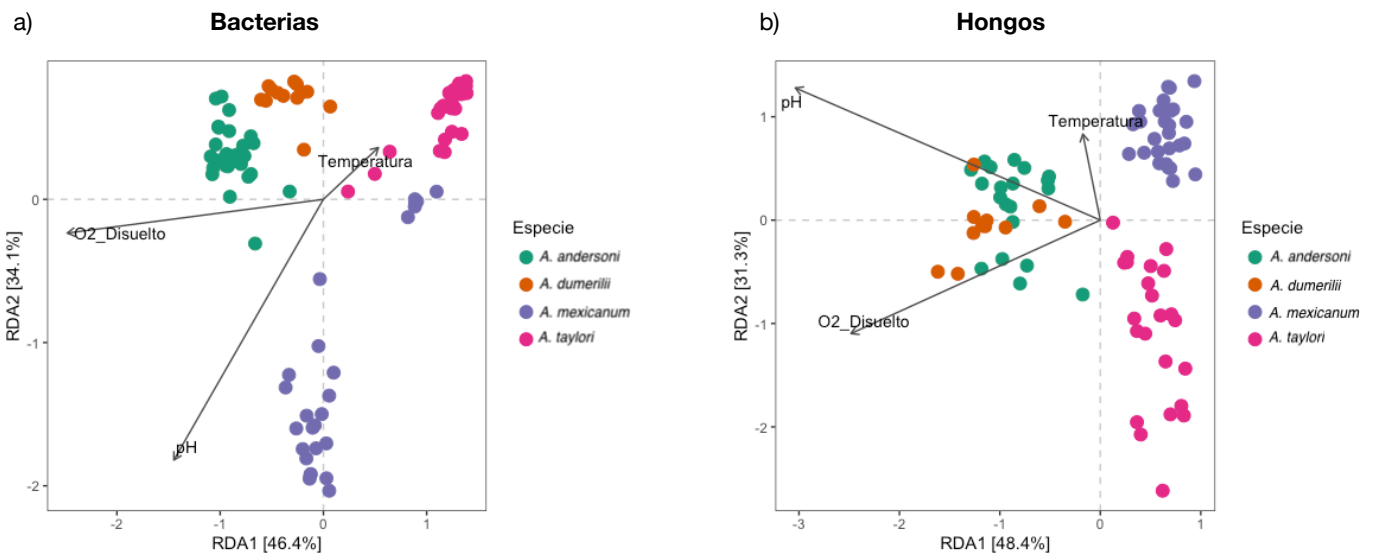


Figura 16. Efecto de los factores abióticos en las comunidades de bacterias y hongos presentes

dbRDA realizado con los factores abióticos y las secuencias de a) 16S e b) ITS. Este fue realizado ocupando los parámetros fisicoquímicos tomados al momento del muestreo y los climáticos recuperados del SIH. Cada especie está representada en un color distinto

Finalmente, para inferir cuáles factores pueden estar relacionados con la composición de la comunidad bacteriana y de hongos, se realizó la correlación del PC1 y PC2 del PCA realizado previamente (Fig. 9) con los taxa a nivel clase. Las variables abióticas que tuvieron más peso en el PC1 fueron el oxígeno disuelto, temperatura media de 1990-2017, conductividad y el pH mientras que en el PC2 fue la precipitación media de 1990-2017. En la comunidad bacteriana la mayoría tuvo correlaciones positivas moderadas ($r = 0.4$) y significativas con el PC1 mientras que con el PC2 la mayoría tuvo correlaciones negativas bajas ($r < 0.4$) y no significativas (Fig. 17a). En la comunidad de hongos únicamente tres clases tuvieron una correlación con los PCs

(Fig. 17b). De estas *Malasseziomycetes* y *Agariomycetes* tuvieron una correlación negativa moderada ($r = -0.5$) y significativa mientras que *Saccharomycetes* tuvo una correlación positiva moderada ($r = 0.25$) y significativa con el PC1.

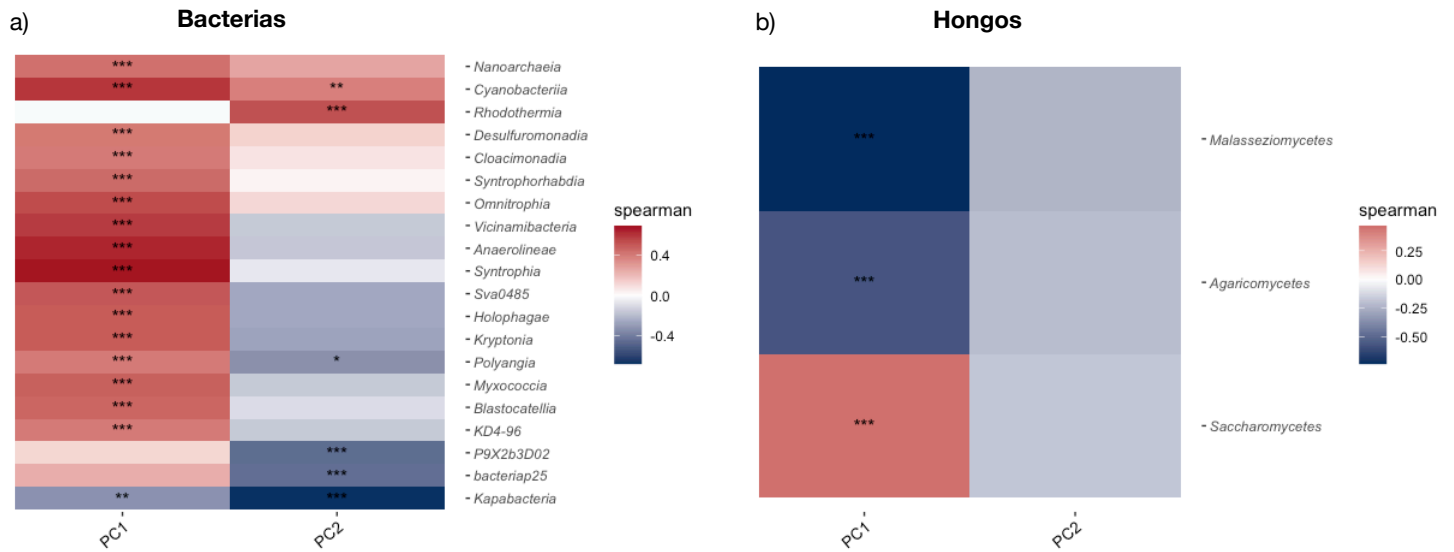


Figura 17. Correlación entre los factores abióticos y las bacterias y hongos presentes en todos los ajolotes
 Mapa de calor que representa la correlación entre los PCs y las clases de a) bacterias y b) hongos. Los factores abióticos que tuvieron más peso en el PC1 fueron el oxígeno disuelto, el pH, la conductividad y la temperatura media de 1990-2017 mientras que en el PC2 fue la precipitación media de 1990-2017. Las correlaciones fueron calculadas utilizando el índice de Spearman. Cada correlación significativa presenta uno o más asteriscos acorde a su p-valor (* - 0.1, ** - 0.5, *** - 0.01).

Discusión

El microbioma de la piel de los ajolotes pedomórficos difiere en su diversidad y estructura de acuerdo con el hábitat

Las comunidades microbianas asociadas a los hospederos han sido caracterizadas para muchas especies, debido al papel importante que tiene la microbiota en la ecología y evolución de los animales (Varela *et al.*, 2018). De estos, uno de los más destacados es la salud, pues se ha observado la presencia de bacterias y hongos capaces de generar metabolitos e interactuar con el ambiente, promoviendo así la protección del hospedero ante microbios exógenos (Bletz *et al.*, 2017b; Hoyt *et al.*, 2019). De ahí que se ha tenido como objetivo entender cuáles son los factores que afectan la composición y estructura de las comunidades microbianas de los organismos hospederos (García-Sánchez *et al.*, 2022).

En el caso de los anfibios, se sabe que su ambiente puede impactar en el microbioma del mismo tanto a gran escala (macroclimática o hábitat) como localmente, a través de diferencias en las condiciones ambientales, uso del microhábitat o interacciones abióticas (García-Sánchez *et al.*, 2022). Por ejemplo, se ha observado que la temperatura del agua (Bletz *et al.*, 2017a) y su calidad (Kueneman *et al.*, 2014) influía en la variación de la estructura de la comunidad microbiana de tres especies de salamandras y ranas. Igualmente, Kueneman *et al.* (2019) reportó que la composición y riqueza del microbioma de la piel de hospederos arbóreos cambiaba de acuerdo a la latitud y en temperaturas más altas. Con respecto a los ajolotes, hasta el momento únicamente se ha descrito el microbioma de *A. rivulare* (Nava-González *et al.*, 2021) y *A. altamirani* (Martínez-Ugalde *et al.*, 2022), ajolotes neoténicos facultativos, y el efecto de ciertos factores abióticos sobre su microbioma. Se reportó que el microbioma de la piel *A. rivulare* estaba principalmente conformado por bacterias pertenecientes a las clases de *Gammaproteobacteria* y *Betaproteobacteria*, además de que la riqueza y abundancia afectaba la intensidad de infección por Bd. Con respecto al microbioma de la piel *A. altamirani* se encontró que este se encuentra influenciado por el estado metamórfico del hospedero y la variación temporal de los factores abióticos.

Si bien estas especies también se encuentran en peligro de extinción a causa de afectaciones en su hábitat, el ser capaces de vivir fuera del agua les brinda más posibilidades de sobrevivir que a los ajolotes neoténicos obligados. De ahí que este trabajo realizó la primera descripción de la microbiota de la piel de cuatro especies de ajolotes neoténicos obligados para posteriormente analizar cuál es el posible papel que tiene el ambiente sobre su microbiota.

En general, la diversidad alfa de bacterias que presentaron todas las especies fue mayor que la observada en hongos. Previamente se ha reportado que las comunidades de hongos comúnmente presentan una diversidad menor comparada con la de bacterias (García-Sánchez *et al.*, 2022); por lo que nuestras observaciones coinciden con datos previos. Asimismo, observamos que la diversidad alfa tanto de bacterias como de hongos fue significativamente distinta entre especies; siendo la diversidad bacteriana de *A. andersoni* y *A. dumerilii* más parecida entre sí y distinta de la de *A. mexicanum* y *A. taylori*. Estas diferencias podrían deberse a la exposición de condiciones climáticas y fisicoquímicas contrastantes, pues se ha observado que existe una fuerte correlación entre el microbioma de las salamandras y su ambiente inmediato (Ellison *et al.*, 2018; Harrison *et al.*, 2019; Jiménez *et al.*, 2016; Ruthsatz *et al.*, 2020). Sin embargo, esto no implica que la diversidad de las comunidades de bacterias y hongos presentes en la piel de estos ajolotes estén influenciadas por los mismos factores abióticos. García-Sánchez *et al.* (2022) observaron que la temperatura y precipitación estacional no afectaba a la comunidad bacteriana presente en la piel de 5 especies distintas de salamandras, pero sí a la de hongos. En humanos y animales acuáticos, como peces e invertebrados, las diferencias en la diversidad del microbioma se han relacionado con otras características como el sexo, la dieta y edad (Ying *et al.*, 2015; Bates *et al.*, 2022). En el caso de los anfibios, se ha reportado que el sexo, la edad y el tamaño del cuerpo no tienen un impacto significativo en la diversidad alfa y la estructura de la comunidad bacteriana (Prado-Irwin *et al.*, 2017; Hughey *et al.*, 2017; Campbell *et al.*, 2019) mientras que la etapa de desarrollo se ha reportado como un factor que afecta al microbioma (Kueneman *et al.*, 2015; Martínez-Ugalde *et al.*, 2022). Considerando que el sexo no tiene un efecto sobre el microbioma y que todos los individuos eran adultos, consideramos que la varianza observada en la diversidad de las comunidades de estas especies no podría estar explicada por alguno de estos factores.

De nuestras especies de estudio, *A. mexicanum* es la única que se encuentra en condiciones de cautiverio, a manera de conservar a la especie, pues los arroyos y canales donde habitaban se encuentran contaminados por múltiples metales pesados (SEMARNAT, 2018). En múltiples especies de anfibios e incluso de mamíferos, el cautiverio se ha reportado como un factor que promueve cambios en el microbioma tanto de la piel como intestinal (Becker *et al.*, 2014; Tong *et al.*, 2019), al ser una condición que reduce el contacto del organismo con los sustratos naturales del ambiente y otros animales (Kueneman *et al.*, 2022). Por ejemplo, se ha observado que el microbioma de la piel de las ranas doradas de Panamá (*Atelopus zeteki*) en estado de

cautiverio fue significativamente diferente en riqueza, abundancia, diversidad filogenética y composición comparado con el de las ranas silvestres (Becker *et al.*, 2014). Sin embargo, este patrón no solo se ha observado en anfibios, sino también en esponjas de mar (Mohamed *et al.*, 2008), loros (Xenoulis *et al.*, 2010) y focas (Nelson *et al.*, 2012). Si bien en el CIBAC las condiciones ambientales asemejan a las silvestres, es imposible simular la gran variedad de condiciones a las cuales se puede exponer en la naturaleza. Debido a que no estudiamos ningún ejemplar de vida libre, este estudio no puede descartar que las diferencias en diversidad observadas en *A. mexicanum* no correspondan a algún efecto del cautiverio sobre el microbioma.

Se encontró que existen diferencias significativas en la diversidad beta de las comunidades bacterianas y de hongos presentes en las especies. En el caso de *A. andersoni* y *A. dumerilii* se observó que sus comunidades son similares, separándose de las de *A. mexicanum* y *A. taylori*, las cuales tienen una comunidad cuya abundancia es similar entre sí, pero difieren en la presencia/ausencia de la comunidad. Las agrupaciones observadas probablemente reflejan la existencia de una asociación geográfica y un hábitat parecido, pues se ha reportado que el ambiente promueve más cambios en la abundancia bacteriana que en la presencia/ausencia de las mismas (Becker *et al.*, 2017; Muletz-Wolz *et al.*, 2018). Algunos estudios han demostrado que la identidad del hospedero es un predictor fuerte de la estructura de las comunidades bacterianas en la piel de anfibios, pues especies que cohabitaban el mismo estanque albergaban distintas comunidades bacterianas (McKenzie *et al.*, 2012; Kueneman *et al.*, 2014). No obstante, otros demuestran que en especies relacionadas estrechamente o poblaciones que pertenecen a la misma especie, el hábitat tiene un papel más importante que la identidad del hospedero (Ellison *et al.*, 2018; Bird *et al.*, 2018). Debido a estas discrepancias, es necesario que en un futuro se estudie el efecto de la identidad de estas especies sobre la piel, pues por el momento los datos ocupados en este trabajo no permiten diferenciarlo del efecto del ambiente.

La composición del microbioma de la piel de los ajolotes pedomórficos y su relación con el ambiente

El microbioma de la piel de las especies estudiadas estuvo conformado por 21 clases bacterianas y 14 de hongos, encontradas en una abundancia relativa mayor al 0.1%. Para el caso de las bacterias, de las 21 clases identificadas, las más predominantes en todas las especies fueron *Gammaproteobacteria* y *Bacteroidia*. La clase *Gammaproteobacteria* se ha encontrado enriquecida en anfibios de Norteamérica, Centroamérica, Europa y Japón (Rebollar

et al., 2016b; Bletz *et al.*, 2017b; Passos *et al.*, 2018), tiene una mayor proporción de cepas anti-Bd (Rebollar *et al.*, 2020) y presenta un grado de inhibición a Bd *in vitro* significativamente más alto que otras clases (Rebollar *et al.*, 2019). Anteriormente, esta clase se ha reportado en dos especies de ajolotes neoténicos facultativos: *A. rivulare*, en el cual resultó ser la clase más abundante (Nava-González *et al.*, 2021), y *A. altamirani*, en el cual forma parte de las taxa que se expresan diferencialmente entre individuos no metamórficos y metamórficos (Martínez-Ugalde *et al.*, 2022). La clase *Bacteroidia* pertenece al filo *Bacteroidetes*, el cual ha sido reportado como uno de los más abundantes en la piel de anfibios y está relacionado con ASVs con capacidades anti-Bd (Kruger, 2020). Previamente, las clases de *Bacteroidia* y *Gammaproteobacteria* han sido encontradas en sistemas de agua dulce cercanos a zonas urbanizadas (Numberger *et al.*, 2022).

Con respecto a los hongos, la clase más predominante fue *Dothideomycetes*, la cual está presente en el microbioma de la piel de otros anfibios como el sapo boreal de Colorado (*Anaxyrus boreas*) y ranas venenosas (*Dendrobates auratus*, *D. leucomelas* y *D. tinctorius*) (Kueneman *et al.*, 2015; Kearns *et al.*, 2017). A pesar de que es sabido que los hongos pueden producir compuestos anti-microbianos (Strobel & Daisy, 2003), no se conoce a profundidad sus efectos en la salud de los anfibios. De ahí que ninguna de estas clases ha sido reportada con capacidades anti-Bd o algún papel relevante para la salud del ajolote; únicamente se han encontrado aislados con la capacidad de inhibir el crecimiento de Bd asociados al filo *Ascomycota* (Kearns *et al.*, 2017).

Al cuantificar el número de ASVs únicos de cada especie y compartidos entre ellas, se observó que *A. andersoni* fue la especie con mayor número de ASVs únicos tanto para bacterias como para hongos. En total se encontraron 88 ASVs de bacterias compartidos entre todas las especies, los cuales correspondieron a 8 clases y 20 órdenes distintos. De estos el orden *Burkholderiales*, de la clase *Gammaproteobacteria*, fue el más abundante en las cuatro especies, con una abundancia relativa entre el 30-60% dependiendo de la especie. El resto de los órdenes se encontraron presentes en una abundancia relativa menor o igual al 20%, como *Pseudomonadales* y *Flavobacteriales*. Previamente, se han encontrado cepas del orden *Burkholderiales* que inhiben el crecimiento de Bd en pruebas de laboratorio (Kueneman *et al.*, 2015; Ellison *et al.*, 2021) y que la familia *Burkholderiaceae*, perteneciente a este orden, se encuentra altamente abundante en el microbioma de la piel de *Ambystoma altamirani* (Martínez-Ugalde *et al.*, 2022). Igualmente, la familia *Pseudomonadaceae*, perteneciente al orden *Pseudomonadales*, se encuentra en la piel de anfibios y ha demostrado ser antifúngica

(Loudon *et al.*, 2014b) mientras que la familia *Flavobacteriaceae*, perteneciente al orden *Flavobacteriales*, ha sido relacionada tanto con proteger a los anfibios de enfermedades (Becker *et al.*, 2014) como con mejorar el crecimiento de Bd en co-cultivos (Woodhams *et al.*, 2015; Rebollar *et al.*, 2016b; Bates *et al.*, 2018).

Con respecto a la comunidad de hongos, se encontraron 62 ASVs compartidos entre todas las especies, los cuales correspondieron a 10 clases y 12 órdenes distintos. De estos el orden *Capnodiales*, de la clase *Dothideomycetes*, fue el más abundante en las cuatro especies. Este orden es principalmente conocido por ser patógeno de hojas (Hyde *et al.*, 2013) y se encuentra presente de manera abundante en salamandras de montaña, localizadas en el centro de México (García-Sánchez *et al.*, 2022). Sin embargo, no se ha asociado a alguna función en particular en el microbioma. El grupo *Dothideomycetes* está adaptado a hábitats de agua dulce y salada (Gnavi *et al.*, 2014), además de que ha sido identificado en ambientes extremos y fríos (Onofri *et al.*, 2008). Varios miembros de este grupo son patógenos virulentos de otros hongos, insectos y plantas con gran importancia económica (Onofri *et al.*, 2008).

En conjunto, estos resultados sugieren que el microbioma de la piel de los ajolotes pedomórficos mantiene un grupo de bacterias y hongos independientemente de la especie. La existencia de un grupo de clases y ASVs compartidos entre las cuatro especies resulta beneficiosa para el hospedero, pues si una función metabólica esencial se llevara a cabo por un solo ASV, este podría perderse fácilmente, afectando la adecuación del hospedero (Varela *et al.*, 2018). Es posible que la existencia de estos ASVs esté relacionada con su genética, pues se reportó que de todas las salamandras que integran al complejo *Ambystoma tigrinum* (Recuero *et al.*, 2010) las cuatro estudiadas en este trabajo conformaban un cluster genético en el centro de México (Everson *et al.*, 2020).

Por otro lado, debido a que el microbioma de la piel se encuentra en constante contacto con el ambiente (Ruthsatz *et al.*, 2020), es probable que ciertas características ambientales sean las que estén promoviendo la permanencia de estas clases de bacterias y hongos en el microbioma. Baste, como muestra el microbioma de la piel de tres especies de salamandras del género *Plethodon* que co-habitaban distintas lagunas, cuya variación en abundancia estuvo explicada por el pH del suelo y no por la genética del hospedero (Muletz-Wolz *et al.*, 2018). En *Eleutherodactylus coqui*, rana puertorriqueña, se observó que la ubicación geográfica y el tiempo de muestreo influenciaban la composición del microbioma de la piel. De manera similar el efecto del ambiente también se ha observado en otras especies, como las

ballenas jorobadas (*Megaptera novaeangliae*), cuyo microbioma de la piel cambia temporal y regionalmente en respuesta a los cambios estacionales en la temperatura del agua del Océano Sur (Bierlich *et al.*, 2018).

A pesar de que varios estudios presentan a la identidad taxonómica del anfibio acuático como un predictor más fuerte de la composición microbiana que el ambiente (Bird *et al.*, 2018) mientras que otros observan lo contrario (Ellison *et al.*, 2018), lo más seguro es que ambos factores estén influyendo al momento de definir a las comunidades que conforman al microbioma de la piel del hospedero. Por ejemplo, se ha observado que en *Eleutherodactylus coqui* la temperatura es un filtro ambiental que permite que solo crezcan bacterias con características específicas mientras que los factores del hospedero seleccionan a los microbios en baja abundancia del ambiente; modelando en conjunto a las bacterias capaces de colonizar la piel (Longo & Zamudio, 2017). Esta interacción entre los factores abióticos y el genotipo del hospedero no solo se ha observado en anfibios sino también en plantas, pues estos interactúan para afectar la colonización de patógenos en *Arabidopsis thaliana* (Agler *et al.*, 2016) mediante dar la señal a los microbios más interconectados de la comunidad para que estos a su vez den una señal de protección a cada microbio que conforma al microbioma.

En otros estudios se ha reportado que entre el hospedero y el ambiente se comparte una proporción de ASVs, los cuales se encuentran presentes en el ambiente en una baja abundancia (Walke *et al.*, 2014; Loudon *et al.*, 2016; Rebollar *et al.*, 2016a; Bates *et al.*, 2018). Es posible entonces que los ASVs únicos encontrados sean un reflejo del peculiar ambiente que rodea al ajolote, cuyo microbioma está igualmente influenciado por las condiciones climáticas y fisicoquímicas del lugar. Se ha observado que el pH, la salinidad y el clima son promotores importantes de la diversidad del microbioma ambiental (Ruthsatz *et al.*, 2020). Debido a que patrones similares se han encontrado en el microbioma de anfibios, sugerimos que los factores abióticos no solo tienen un efecto directo en el microbioma del ajolote sino también indirecto, pues al afectar al microbioma de su ambiente modifican la reserva de bacterias y hongos a partir de la cual puede seleccionar el ajolote a los microbios que definen a su microbiota.

El objetivo de este trabajo no buscaba directamente evaluar la presencia de Bd, sin embargo es importante resaltar que nuestros resultados confirman que el microbioma de la piel de múltiples especies de *Ambystoma* está integrado por bacterias y hongos con la capacidad de proteger al hospedero y hacerlo menos susceptible a infecciones por Bd. No obstante, se

tienen que realizar más pruebas para confirmar su capacidad de inhibición al crecimiento de Bd y en qué magnitud pueden hacerlo. Debido a que aún no se han realizado los análisis de los datos que evalúan la infección por Bd tomados al momento del muestreo, no es posible concluir si la presencia de estas comunidades en el microbioma está relacionada con la aparición de Bd en el ambiente. De ser que se encontrara Bd en estos individuos, sería interesante realizar el muestreo del microbioma de la piel en distintas épocas del año como una manera de conocer qué tan vulnerables son estos ajolotes, qué elementos abióticos son los que promueven su susceptibilidad y qué medidas de conservación podrían emplearse a futuro, pues de acuerdo a diferentes estudios (Bolom-Huet *et al.*, 2019; Monroy-Vilchis *et al.*, 2019; Nava-González *et al.*, 2019) el ENT resulta una región viable para el desarrollo de Bd.

Las variaciones climáticas y fisicoquímicas dan un carácter específico al microbioma

La temperatura ambiental ha presentado ascensos y descensos desde 1970 hasta 2017, yendo en continuo aumento desde 1990 en todos los sitios. Estos resultados son congruentes con lo reportado en otros estudios realizados en el país, en donde se observa que la temperatura media era menor en años anteriores a 1990 (Arnauld *et al.*, 1994; Medina-Orozco *et al.*, 2019); reportando a 1990, 1995, 1997 y 1998 como los años más calurosos a nivel global (Jones *et al.*, 1999). A consecuencia del cambio climático, esta situación no cambio con los años, pues a partir de los 2000's ocurrieron los 19 años más calurosos, en los cuales la frecuencia, intensidad y duración de los eventos extremos de temperatura aumentó a nivel global (Zhao *et al.*, 2021).

La exposición a temperaturas ambientales no óptimas ha estado asociada a alteraciones en el microbioma intestinal y de la piel (Sepulveda & Moeller, 2020; Wang *et al.*, 2022). En el salmón chum (*Oncorhynchus keta*) los cambios en la temperatura del agua se consideran un factor causante de disbiosis, pues al modificar otros parámetros fisicoquímicos, es capaz de favorecer el crecimiento de especies patógenas de *Vibrio* durante temporadas cálidas (Ghosh *et al.*, 2022). En vista de que los anfibios son ectotermos (Bletz *et al.*, 2017a), es decir que acoplan su temperatura corporal a la del ambiente, es posible que los continuos ascensos en la temperatura estén influyendo en el crecimiento de la taxa asociada a la piel de los ajolotes, en las interacciones entre los miembros de la comunidad y en su capacidad antifúngica.

Por otro lado, en este trabajo se observó que a partir de la década de los 90's hubo meses donde se presentaron menos precipitaciones y existió un cambio de fase en la temporada de lluvias, la cual hasta hace varias décadas tomaba lugar de mayo a octubre (Bravo-Cabrera *et*

al., 2017). Es posible que estos cambios en los patrones de precipitación estén relacionados con el efecto observado del oxígeno disuelto y conductividad sobre la comunidad microbiana, pues se ha evidenciado que ambos parámetros son los más afectados por la precipitación (Poff *et al.*, 2002). De acuerdo con lo anterior y a que los cambios regionales en los patrones de precipitación repercuten en las características hidrológicas del sistema (Poff *et al.*, 2002; Milly *et al.* 2005), se sugiere que los cambios observados en la fase de precipitación podrían haber alterado la composición de las lagunas en las que habitan los ajolotes; impactando en la estructura de los ensamblajes microbianos de los lagos y modificando la reserva de microbios sobre la cual actúan procesos de selección positiva o negativa que determinan a los microbios que se toman del ambiente para la integración del microbioma de la piel del hospedero.

Al analizar la influencia del clima y las condiciones fisicoquímicas sobre el microbioma, se encontró que la diversidad y composición de la comunidad bacteriana y fúngica de las distintas especies está influida, principalmente, por los parámetros fisicoquímicos. Esto va de acuerdo a lo demostrado en otros estudios, donde el pH, la temperatura del agua y la salinidad son los predictores principales de las comunidades microbianas en el hospedero (Kueneman *et al.*, 2014; Lozupone & Knight, 2007; Martínez-Ugalde *et al.*, 2022; Ruthsatz *et al.*, 2020). Sin embargo, debido a que la temperatura es capaz de promover los cambios en el pH, la conductividad y el oxígeno disuelto que impactan a la comunidad microbiana (Alcocer *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2017), sugiero que la temperatura de cada laguna es el principal factor ambiental que influye sobre la diversidad y composición del microbioma de la piel. No obstante, esto debe de tomarse con cautela debido a que la temperatura del agua es un parámetro que varía a lo largo del año (Trombetta *et al.*, 2022) y de acuerdo a la profundidad (Pilla *et al.*, 2020).

De acuerdo con lo anterior, se ha evidenciado que los sitios con menor profundidad, como las lagunas de Pátzcuaro y Zacapu, son más afectados por los aumentos en la temperatura del aire (Caissie, 2005). De ahí que las aguas profundas, como la laguna de Alchichica, sean fisicoquímicamente más estables mientras que las menos profundas tienden a ser más variables (Stefansdottir *et al.*, 2010, Spivak *et al.*, 2017); condición que termina alterando las concentraciones de oxígeno disuelto disponible y por ende, modificando los procesos biológicos de los organismos que ahí habitan así como las interacciones ecológicas entre ellos (Ockendon *et al.*, 2014). Basado en estas evidencias es posible que las similitudes encontradas en la diversidad y estructura del microbioma entre *A. dumerilii* y *A. andersoni*,

ajolotes que habitan la laguna de Pátzcuaro y Zacapu, respectivamente, se deban en parte a una relación entre la temperatura y la profundidad a la que normalmente se encuentran. No obstante, por el momento no se puede comprobar esta hipótesis pues no contamos con datos de temperatura a lo largo del año. De ahí que para comprobar el efecto de la temperatura sobre otros factores será necesario realizar muestreo que incluya la toma de mediciones fisicoquímicas y del microbioma de la piel de estos ajolotes en distintas temporadas.

Considerando que cada localidad resultó ser significativamente diferente a las otras con respecto a sus parámetros fisicoquímicos, se concluye que parte de la varianza observada en el microbioma de la piel de los ajolotes pedomórficos es atribuible a las diferencias en las condiciones fisicoquímicas a las que estuvieron expuestos antes y durante el muestreo. Es posible que incluso algunos taxa encontrados en el microbioma de los ajolotes pedomórficos durante este trabajo se modifiquen conforme varían las condiciones ambientales a lo largo de las temporadas. Por ejemplo, anteriormente, se ha observado en *Lithobates yavapaiensis* y *Eleutherodactylus coqui* (Longo *et al.*, 2015), anfibios afectados por Bd, y en el panda rojo gigante (Ma *et al.*, 2021), que la estructura de la comunidad bacteriana es mayor en temporadas como primavera y verano mas no en invierno. Debido a que pueden ocurrir múltiples cambios en las variables ambientales a lo largo del año y que estos a su vez repercuten en el microbioma del hospedero (Longo *et al.*, 2015; Tong *et al.*, 2019; Martínez-Ugalde *et al.*, 2022), es que consideramos que este trabajo es solo un primer acercamiento a definir cómo el ambiente puede afectar al microbioma de la piel de los ajolotes pedomórficos. Por lo cual se requieren de otros estudios que permitan conocer cómo es la interacción entre los parámetros ambientales y fisicoquímicos de los sitios así como realizar modelos de correlación entre el ambiente y el microbioma más complejos; esto último con el fin de poder eliminar aquellas covariables ambientales y definir cómo están afectando al microbioma.

Conclusiones

1. Cada laguna tiene una composición fisicoquímica característica; sin embargo en todas se observó que la precipitación anual y temperatura media han aumentado con el paso de los años.
2. La diversidad y estructura del microbioma de la piel de los ajolotes pedomórficos difiere entre determinadas especies. No obstante, presenta una composición similar con respecto a los grupos taxonómicos más abundantes.
3. Los parámetros climáticos y fisicoquímicos tienen una influencia en la diversidad y estructura del microbioma de la piel de los ajolotes pedomórficos.

Perspectivas

A lo largo de este trabajo se observó como el efecto del ambiente no se puede distinguir de la identidad del hospedero. Previos trabajos han podido determinar esto en diferentes sistemas de estudio, como murciélagos (Lemieux-Labonté *et al.*, 2016), ballenas (Bierlich *et al.*, 2018) y otros anfibios (McKenzie *et al.*, 2012; Ellison *et al.*, 2018; Kruger *et al.*, 2020), la distribución restringida a una sola localidad que tienen los ajolotes pedomórficos hace imposible poder evaluar *in situ* si el microbioma de una misma especie puede cambiar de acuerdo a las características abióticas de diferentes localidades. De ahí que para poder diferenciar los efectos del ambiente de los del hospedero será necesario realizar experimentos de jardín común en los cuales expondremos a las distintas especies a las mismas condiciones abióticas. Si observamos que después de un tiempo el microbioma cambia, entonces podríamos estar hablando de que los factores intrínsecos del ajolote tienen un efecto sobre el microbioma. Otra posibilidad es analizar si existe presencia de especies simpátricas en las lagunas donde estos ajolotes se desarrollan; de ser que sí, sería posible realizar comparaciones entre esta y el ajolote para determinar el efecto del hospedero sobre el microbioma.

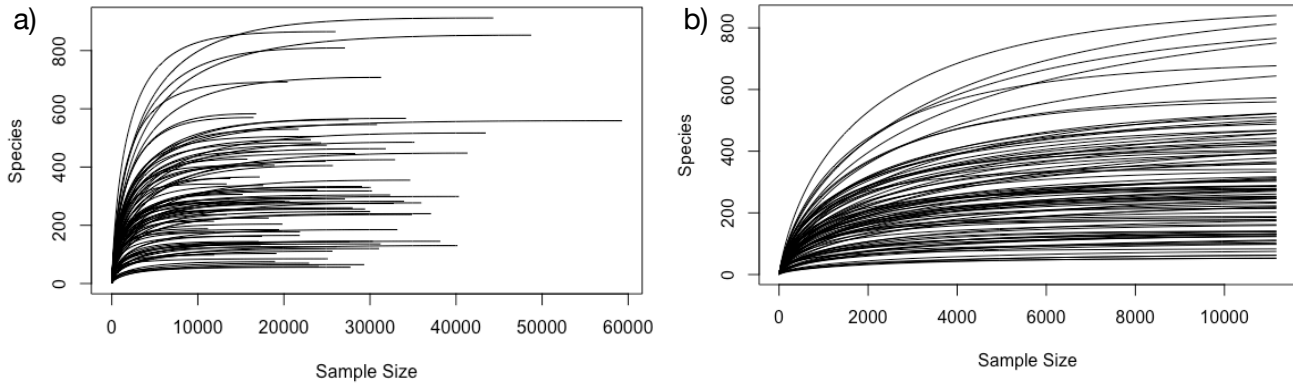
De acuerdo con lo anterior, otros compañeros del laboratorio ya se encuentran trabajando tanto en el análisis de la genética del hospedero, mediante polimorfismos de un solo

nucleótido (SNPs, por sus siglas en inglés), así como en el análisis de la microbiota ambiental de las lagunas. Esto con el propósito de poder determinar cuál es la relación entre el hospedero y los factores abióticos en la determinación del microbioma de los ajolotes.

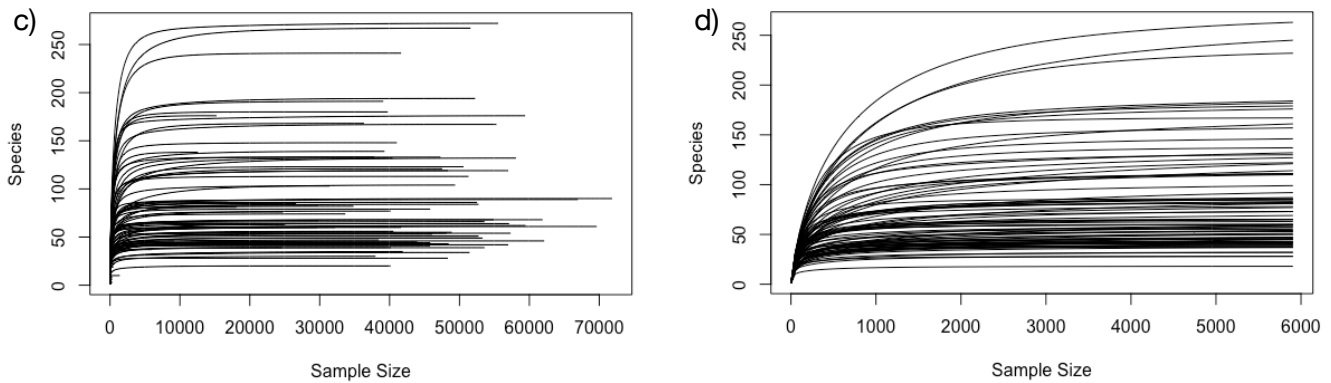
A futuro se espera realizar análisis ambientales basados en más mediciones climáticas y fisicoquímicas en el tiempo, pues es posible que las mediciones que utilizamos no sean suficientes para capturar las señales climáticas y fisicoquímicas que correlacionan con la variación observada entre sitios de la comunidad presente en el microbioma. Asimismo, será necesario investigar el efecto de los minerales y nutrientes que se encuentran en el suelo y del efecto antropogénico, no estudiados en este trabajo, sobre el microbioma de las distintas especies, pues se han reportado como que afectan a las comunidades microbianas presentes en la piel (Becker *et al.*, 2017; Barnes *et al.*, 2021). Finalmente, sería ideal realizar predicciones matemáticas sobre los cambios ambientales que se esperarían observar a manera de promover los esfuerzos de protección y conservación de estas especies.

Anexos

16S



ITS



Anexo 1. Curvas de rarefacción de 16S e ITS

a) Curva antes de realizar la rarefacción de las secuencias de 16S. b) Curva posterior a la rarefacción cuyo corte fue de 11,167 secuencias para 16S. c) Curva antes de realizar la rarefacción de las secuencias de ITS. d) Curva posterior a la rarefacción cuyo corte fue de 5,904 secuencias para ITS.

Anexo 2. Comparaciones estadísticas de parámetros fisicoquímicos			
Parámetro	Comparación	P-valor	Significancia
pH	Alchichica-Patzcuaro	0.00067	***
	Alchichica-Zacapu	0.09927	***
	Alchichica-Xochimilco	6.8E-05	ns
	Patzcuaro-Zacapu	0.03144	*
	Patzcuaro-Xochimilco	7.8E-06	ns
	Zacapu-Xochimilco	0.01032	ns
Temperatura	Alchichica-Patzcuaro	0.01232	*
	Alchichica-Zacapu	0.00087	***
	Alchichica-Xochimilco	0.00010	***
	Patzcuaro-Zacapu	2.5E-05	****
	Patzcuaro-Xochimilco	1.9E-07	****
	Zacapu-Xochimilco	0.38084	ns
Oxígeno Disuelto	Alchichica-Patzcuaro	0.00072	***
	Alchichica-Zacapu	0.00169	**
	Alchichica-Xochimilco	0.00012	***
	Patzcuaro-Zacapu	0.56754	ns
	Patzcuaro-Xochimilco	2.1E-07	****
	Zacapu-Xochimilco	4.5E-07	****
Conductividad	Alchichica-Patzcuaro	0.00071	***
	Alchichica-Zacapu	0.00087	***
	Alchichica-Xochimilco	0.00012	***
	Patzcuaro-Zacapu	2.4E-05	****
	Patzcuaro-Xochimilco	2.2E-07	****
	Zacapu-Xochimilco	4.8E-07	****

Anexo 3. Contribuciones a los PCs

Parámetros	PCs					
	1	2	3	4	5	6
pH	20.0843260	0.1379401	10.930063	6.720811E+01	1.5963359	0.04322031
Temperatura	2.0538635	7.5981035	68.880389	4.165565E+00	16.2703174	1.03176220
Oxígeno Disuelto	28.8577652	5.4484731	3.843148	8.546638E-01	57.1779807	3.81796916
Conductividad	24.2999670	19.0075850	2.263085	5.144246E+00	1.0588836	48.22623318
Precipitación Mediana de 1990-2017	0.2610657	63.1018698	3.614996	9.24574E-07	0.0124227	33.00964497
Temperatura Mediana de 1990-2017	24.4430127	4.7060285	10.468319	2.262741E+01	23.8840599	13.87117019

Referencias

A

- Aguilar-Miguel, X. (2005). Algunas especies de anfibios y reptiles contenidos en el Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-059-ECOL-2000. Facultad de Ciencias, Centro de Investigación en Recursos Bióticos, Universidad Autónoma del Estado de México. Bases de datos SNIB-CONABIO. Proyecto No. W035. México, D.F.
- Agler, M. T., Ruhe, J., Kroll, S., Morhenn, C., Kim, S.-T., Weigel, D., & Kemen, E. M. (2016). Microbial hub taxa link host and abiotic factors to plant microbiome variation. *PLOS Biology*, 14(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002352>
- Alcocer, J., E. Escobar, M. R. Sánchez & G. Vilaclara. (2000). Water column stratification and its implications in the tropical warm monomictic Lake Alchichica, Puebla, Mexico. *Verhandlungen Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie* 27: 3166- 3169.
- Alcocer D., J., Escolero F., Ó., & Marín S., L. (2004). Problemáticas del agua de la cuenca oriental, estados de Puebla, Veracruz y Tlaxcala. In *El agua en México vista desde la academia* (1st ed.). México.
- Alroy, J. (2015). Current extinction rates of reptiles and amphibians. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 112(42), 13003-13008. doi: 10.1073/pnas.1508681112
- Arnould, C., Carot, P., & Fauvet-Berthelot, M. (1994). Introducción. In Pétrequin, P. (Ed.), *Ocho mil años de la Cuenca de Zacapú: Evolución de los paisajes y primeros desmontes*. Centro de estudios mexicanos y centroamericanos. doi:10.4000/books.cemca.2345
- Arredondo Figueroa, J.L., Vera Mackintosh O., Ortiz Linas, A.O. (1984). Análisis de Componentes Principales y Cúmulos de datos limnológicos, en el lago de Alchichica, Puebla. *Biótica*, 9, 23-39.

B

- Basanta, M., Rebollar, E., & Parra-Olea, G. (2019). Potential risk of *Batrachochytrium salamandrivorans* in Mexico. *PLOS ONE*, 14(2), e0211960. doi: 10.1371/journal.pone.0211960
- Bates K. A., Clare F. C., O’Hanlon S., Bosch J., Brookes L., Hopkins K., et al. (2018). Amphibian chytridiomycosis outbreak dynamics are linked with host skin bacterial community structure. *Nat. Commun.* 9:693. 10.1038/s41467-018-02967-w
- Bates, K. A., Higgins, C., Neiman, M., & King, K. C. (2022). Turning the tide on sex and the microbiota in Aquatic Animals. *Hydrobiologia*. <https://doi.org/10.1007/s10750-022-04862-4>
- 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*). *Biol. Conserv.* 176, 199–206
- Becker, C. G., Longo, A. V., Haddad, C. F. B. & Zamudio, K. R. (2017). Land cover and forest connectivity alter the interactions among host, pathogen and skin microbiome. *Proc. Biol. Sci.* 284, pii: 20170582.
- Bernardo-Cravo, A. P., Schmeller, D. S., Chatzinotas, A., Vredenburg, V. T., & Loyau, A. (2020). Environmental factors and host microbiomes shape host–pathogen dynamics. *Trends in Parasitology*, 36(7), 616–633. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.04.010>
- Bielby, J., Cooper, N., Cunningham, A., Garner, T., & Purvis, A. (2008). Predicting susceptibility to future declines in the world's frogs. *Conservation Letters*, 1(2), 82-90. doi: 10.1111/j.1755-263x.2008.00015.x
- Bierlich, K. C., Miller, C., DeForce, E., Friedlaender, A. S., Johnston, D. W., & Apprill, A. (2018). Temporal and regional variability in the skin microbiome of humpback whales along the western Antarctic Peninsula. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(5). <https://doi.org/10.1128/aem.02574-17>
- Bisanz, E. J. (2018). qiime2R: Importing QIIME2 artifacts and associated data into R sessions. <https://github.com/jbisanz/qiime2R>.

- Bletz, M., Perl, R., Bobowski, B., Japke, L., Tebbe, C., & Dohrmann, A. et al. (2017a). Amphibian skin microbiota exhibits temporal variation in community structure but stability of predicted Bd-inhibitory function. *The ISME Journal*, 11(7), 1521-1534. doi: 10.1038/ismej.2017.41
- Bletz, M., Archer, H., Harris, R., McKenzie, V., Rabemananjara, F., Rakotoarison, A., & Vences, M. (2017b). Host Ecology Rather Than Host Phylogeny Drives Amphibian Skin Microbial Community Structure in the Biodiversity Hotspot of Madagascar. *Frontiers In Microbiology*, 8. doi: 10.3389/fmicb.2017.01530.
- Bokulich, N., Kaehler, B., Rideout, J., Dillon, M., Bolyen, E., & Knight, R. et al. (2018). Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. *Microbiome*, 6(1). doi: 10.1186/s40168-018-0470-z
- Bolom-Huet, R., Pineda, E., Díaz-Fleischer, F., Muñoz-Alonso, A., & Galindo-González, J. (2019). Known and estimated distribution in Mexico of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a pathogenic fungus of amphibians. *Biotropica*, 51(5), 731-746. doi: 10.1111/btp.12697
- Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, et al. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology* 37: 852–857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>
- Bravo-Cabrera, J. L., Azpra-Romero, E., Zarraluqui-Such, V., & Gay-García, C. (2017). Effects of El Niño in Mexico during rainy and dry seasons: an extended treatment. *Atmósfera*, 30(3), 221-232. <https://doi.org/10.20937/atm.2017.30.03.03>
- Brown, D. D., & Cai, L. (2007). Amphibian metamorphosis. *Developmental biology*, 306(1), 20–33. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.03.021>
- Byrd, A. L., Belkaid, Y., & Segre, J. A. (2018). The human skin microbiome. *Nature reviews. Microbiology*, 16(3), 143–155. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.157>

C

- Caissie, D., Satish, M.G., El-Jabi, N. (2005). Predicting river water temperatures using the equilibrium temperature concept with application on Miramichi River catchments (New Brunswick, Canada). *Hydrol. Process.* 19, 2137–2159. <https://doi.org/10.1002/hyp.5684>.
- Callahan, B., McMurdie, P., Rosen, M., Han, A., Johnson, A., & Holmes, S. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581–583. doi: 10.1038/nmeth.3869
- Campbell, L. J., Garner, T. W., Hopkins, K., Griffiths, A. G., & Harrison, X. A. (2019). Outbreaks of an emerging viral disease covary with differences in the composition of the skin microbiome of a wild united kingdom amphibian. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01245>
- Cheng, T., Rovito, S., Wake, D., & Vredenburg, V. (2011). Coincident mass extirpation of neotropical amphibians with the emergence of the infectious fungal pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 108(23), 9502-9507. doi: 10.1073/pnas.1105538108
- Conway, J., Lex, A., & Gehlenborg, N. (2017). UpSetR: an R package for the visualization of intersecting sets and their properties. *Bioinformatics*, 33(18), 2938-2940. doi: 10.1093/bioinformatics/btx364

D

- Daskin, J., Bell, S., Schwarzkopf, L., & Alford, R. (2014). Cool Temperatures Reduce Antifungal Activity of Symbiotic Bacteria of Threatened Amphibians – Implications for Disease Management and Patterns of Decline. *Plos ONE*, 9(6), e100378. doi: 10.1371/journal.pone.0100378

E

- Ellison, S., Rovito, S., Parra-Olea, G., Vásquez-Almazán, C., Flechas, S., Bi, K., & Vredenburg, V. (2018). The Influence of Habitat and Phylogeny on the Skin Microbiome of

Amphibians in Guatemala and Mexico. *Microbial Ecology*, 78(1), 257-267. doi: 10.1007/s00248-018-1288-8

- Ellison, S., Knapp, R., & Vredenburg, V. (2021). Longitudinal patterns in the skin microbiome of wild, individually marked frogs from the Sierra Nevada, California. *ISME Communications*, 1(1). doi: 10.1038/s43705-021-00047-7

F

- Farkas, J. E., & Monaghan, J. R. (2015). Housing and maintenance of *Ambystoma mexicanum*, the Mexican axolotl. In *Salamanders in Regeneration Research* (pp. 27-46). Humana Press, New York, NY.
- Frost, D. R. (2013). Amphibian species of the world: an online reference. Version 5.6. <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia>.

G

- García-Sánchez, J., Arredondo-Centeno, J., Segovia-Ramírez, M., Tenorio Olvera, A., Parra-Olea, G., Vredenburg, V., & Rovito, S. (2022). Factors Influencing Bacterial and Fungal Skin Communities of Montane Salamanders of Central Mexico. *Microbial Ecology*. doi: 10.1007/s00248-022-02049-x
- Ghosh, S. K., Wong, M. K.-S., Hyodo, S., Goto, S., & Hamasaki, K. (2022). Temperature modulation alters the gut and skin microbial profiles of chum salmon (*Oncorhynchus keta*). *Frontiers in Marine Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.1027621>
- Gnani, G., Ercole, E., Panno, L., Vizzini, A., & Varese, G. (2014). Dothideomycetes and Leotiomyces sterile mycelia isolated from the Italian seagrass *Posidonia oceanica* based on rDNA data. *Springerplus*, 3 (1). doi: 10.1186/2193-1801-3-508
- Grice, E. A., & Segre, J. A. (2011). The skin microbiome. *Nature reviews. Microbiology*, 9(4), 244-253. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2537>

H

- Harrison, X. A., Price, S. J., Hopkins, K., Leung, W., Sergeant, C., & Garner, T. (2017). Host Microbiome Richness Predicts Resistance to Disturbance by Pathogenic Infection in a Vertebrate Host. <https://doi.org/10.1101/158428>
- Harrison, X. A., Price, S. J., Hopkins, K., Leung, W., Sergeant, C., & Garner, T. (2019). Diversity-Stability Dynamics of the Amphibian Skin Microbiome and Susceptibility to a Lethal Viral Pathogen. *Frontiers in microbiology*, 10, 2883. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02883>
- Heatwole HE, Barthalmus GT. (1994). The integument. In: Amphibian biology. Chipping Norton: Surrey Beatty & Sons; 1994. 28.
- Hoke, A., Woodhouse, J., Zoccarato, L., McCarthy, V., de Eyto, E., & Calderó-Pascual, M. et al. (2020). Impacts of Extreme Weather Events on Bacterial Community Composition of a Temperate Humic Lake. *Water*, 12(10), 2757. doi: 10.3390/w12102757
- Hyde, K., Jones, E., Liu, J., Ariyawansa, H., Boehm, E., & Boonmee, S. et al. (2013). Families of Dothideomycetes. *Fungal Diversity*, 63 (1), 1-313. doi: 10.1007/s13225-013-0263-4
- Hyndman R, Athanasopoulos G, Bergmeir C, Caceres G, Chhay L, O'Hara-Wild M, Petropoulos F, Razbash S, Wang E, Yasmien F (2022). *forecast: Forecasting functions for time series and linear models*. R package version 8.17.0, <https://pkg.robjhyndman.com/forecast/>.

J

- Jiménez, R., & Sommer, S. (2016). The amphibian microbiome: natural range of variation, pathogenic dysbiosis, and role in conservation. *Biodiversity And Conservation*, 26(4), 763-786. doi: 10.1007/s10531-016-1272-x
- Jiménez, R., Alvarado, G., Sandoval, J., & Sommer, S. (2020). Habitat disturbance influences the skin microbiome of a rediscovered neotropical-montane frog. *BMC Microbiology*, 20(1). doi: 10.1186/s12866-020-01979-1

- Jones, P., New, M., Parker, D., Martin, S., & Rigor, I. (1999). Surface air temperature and its changes over the past 150 years. *Reviews Of Geophysics*, 37(2), 173-199. doi: 10.1029/1999rg900002
- Jones, L., Muhlfeld, C., & Hauer, F. (2017). Temperature. *Methods In Stream Ecology*, Volume 1, 109-120. doi: 10.1016/b978-0-12-416558-8.00006-8

K

- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K., & Miyata, T. (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic acids research*, 30(14), 3059–3066. <https://doi.org/10.1093/nar/gkf436>
- Kearns, P., Fischer, S., Fernández-Beaskoetxea, S., Gabor, C., Bosch, J., & Bowen, J. et al. (2017). Fight Fungi with Fungi: Antifungal Properties of the Amphibian Mycobiome. *Frontiers In Microbiology*, 8. doi: 10.3389/fmicb.2017.02494
- Krebs, S.L. & Brandon, R.A. 1984. "A new species of salamander (Family Ambystomatidae) from Michoacan, Mexico". (PDF) *Herpetologica*: 238-245.
- Kruger A. (2020). Frog Skin Microbiota Vary With Host Species and Environment but Not Chytrid Infection. *Frontiers in microbiology*, 11, 1330. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01330>
- 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. *Molecular ecology*, 23(6), 1238–1250. <https://doi.org/10.1111/mec.12510>
- Kueneman, J., Woodhams, D., Van Treuren, W., Archer, H., Knight, R., & McKenzie, V. (2015). Inhibitory bacteria reduce fungi on early life stages of endangered Colorado boreal toads (*Anaxyrus boreas*). *The ISME Journal*, 10(4), 934-944. doi: 10.1038/ismej.2015.168
- 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. *Proceedings. Biological sciences*, 283(1839), 20161553. <https://doi.org/10.1098/rspb.2016.1553>
- Kueneman, J., Bletz, M., McKenzie, V., Becker, C., Joseph, M., & Abarca, J. et al. (2019). Community richness of amphibian skin bacteria correlates with bioclimate at the global scale. *Nature Ecology & Evolution*, 3(3), 381-389. doi: 10.1038/s41559-019-0798-1

L

- Leo Lahti, Sudarshan Shetty *et al.* (2017). Tools for microbiome analysis in R. Version. <http://microbiome.github.com/microbiome>
- Lemieux-Labonté, V., Tromas, N., Shapiro, B. J., & Lapointe, F.-J. (2016). Environment and host species shape the skin microbiome of captive Neotropical bats. *PeerJ*, 4. <https://doi.org/10.7717/peerj.2430>
- Liu C, Cui Y, Li X, Yao* M (2021). "microeco: An R package for data mining in microbial community ecology." *FEMS Microbiology Ecology*, 97(2), fiae255. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiae255>.
- Longo, A. V., & Zamudio, K. R. (2017). Temperature variation, bacterial diversity and fungal infection dynamics in the amphibian skin. *Molecular Ecology*, 26(18), 4787–4797. <https://doi.org/10.1111/mec.14220>
- Loudon, A. H., Holland, J. A., Umile, T. P., Burzynski, E. A., Minbiole, K. P., & Harris, R. N. (2014a). Interactions between amphibians' symbiotic bacteria cause the production of emergent anti-fungal metabolites. *Frontiers in microbiology*, 5, 441. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00441>
- Loudon, A. H., Woodhams, D. C., Parfrey, L. W., Archer, H., Knight, R., Mckenzie, V., et al. (2014b). Microbial community dynamics and effect of environmental microbial reservoirs on red-backed salamanders (*Plethodon cinereus*). *ISME J.* 8, 830–840. doi: 10.1038/ismej.2013.200

- Loudon, A., Venkataraman, A., Van Treuren, W., Woodhams, D., Parfrey, L., & McKenzie, V. et al. (2016). Vertebrate Hosts as Islands: Dynamics of Selection, Immigration, Loss, Persistence, and Potential Function of Bacteria on Salamander Skin. *Frontiers In Microbiology*, 7. doi: 10.3389/fmicb.2016.00333
- Lozupone, C. A., & Knight, R. (2007). Global patterns in bacterial diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(27), 11436–11440. doi: 10.1073/pnas.0611525104

M

- Ma, X., Li, G., Yang, C., He, M., Wang, C., Gu, Y., Ling, S., Cao, S., Yan, Q., Han, X., Wen, Y., Zhao, Q., Wu, R., Deng, J., Zuo, Z., Yu, S., Hu, Y., Zhong, Z., & Peng, G. (2021). Skin microbiota of the captive giant panda (*Ailuropoda Melanoleuca*) and the distribution of opportunistic skin disease-associated bacteria in different seasons. *Frontiers in Veterinary Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.666486>
- Martínez-Ugalde, E., Ávila-Akerberg, V., González Martínez, T., Vázquez Trejo, M., Zavala Hernández, D., Anaya Morales, S., & Rebollar, E. (2022). The skin microbiota of the axolotl *Ambystoma altamirani* is highly influenced by metamorphosis and seasonality but not by pathogen infection. *Research Square*. doi: 10.21203/rs.3.rs-1552016/v1
- 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. *The ISME journal*, 6(3), 588–596. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.129>
- McMurdie PJ, Holmes S. (2013). phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS ONE*, 8(4), e61217. <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0061217>.
- Medina-Orozco, L., García-Calderón, N., García Oliva, F., & Elena Ikkonen, E. (2019). Análisis histórico de la pérdida de humedales del Lago de Pátzcuaro, Michoacán, México. *Biotecnia*, 21(2), 83-90. doi: 10.18633/biotecnia.v21i2.933
- Milly, P. C. D., Dunne K. A., and Vecchia A. V. (2005). Global pattern of trends in streamflow and water availability in a changing climate. *Nature* 438 (7066):347-350.
- Mohamed, N. M., Rao, V., Hamann, M. T., Kelly, M., & Hill, R. T. (2008). Monitoring bacterial diversity of the marine sponge *Ircinia strobilina* upon transfer into Aquaculture. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(13), 4133–4143. <https://doi.org/10.1128/aem.00454-08>
- Moncayo Estrada, R., (1996). Estructura y función de la comunidad de peces de la laguna de Zacapu, Michoacán, México. Maestría en Manejo de Recursos Marinos Thesis, Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, La Paz, B. C. S., México, xi, 172 h.
- Monroy-Vilchis, O., Heredia-Bobadilla, R.-L., Zarco-González, M. M., Ávila-Akerberg, V., & Sunny, A. (2019). Genetic diversity and structure of two endangered mole salamander species of the trans-mexican volcanic belt. *Herpetozoa*, 32, 237–248. <https://doi.org/10.3897/herpetozoa.32.e38023>
- Muletz-Wolz, C. R., Yarwood, S. A., Campbell Grant, E. H., Fleischer, R. C., & Lips, K. R. (2018). Effects of host species and environment on the skin microbiome of Plethodontid salamanders. *The Journal of animal ecology*, 87(2), 341–353. doi: 10.1111/1365-2656.12726

N

- National Assessment Synthesis Team. (2000) *Climate Change Impacts on the United States: The Potential Consequences of Climate Variability and Change*. U.S. Global Change Research Program; Washington, DC, USA
- National Weather Service Glossary. (2021). Anomaly. In *National Weather Service Glossary*.
- Nava-González, B. A., Suazo-Ortuño, I., Parra-Olea, G., López-Toledo, L., & Alvarado-Díaz, J. (2019). Batrachochytrium dendrobatidis infection in amphibians from a high elevation habitat in the trans-mexican volcanic belt. *Aquatic Ecology*, 54(1), 75–87. <https://doi.org/10.1007/s10452-019-09727-y>

- Nava-González, B., Suazo-Ortuño, I., López, P., Maldonado-López, Y., Lopez-Toledo, L., & Raggi, L. et al. (2021). Inhibition of *Batrachochytrium dendrobatidis* Infection by Skin Bacterial Communities in Wild Amphibian Populations. *Microbial Ecology*, 82(3), 666-676. doi: 10.1007/s00248-021-01706-x
- Nelson, T. M., Rogers, T. L., Carlini, A. R., & Brown, M. V. (2012). Diet and phylogeny shape the gut microbiota of Antarctic Seals: A comparison of wild and captive animals. *Environmental Microbiology*, 15(4), 1132–1145. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12022>
- Nilsson, R. H., Larsson, K. H., Taylor, A., Bengtsson-Palme, J., Jeppesen, T. S., Schigel, D., Kennedy, P., Picard, K., Glöckner, F. O., Tedersoo, L., Saar, I., Kõljalg, U., & Abarenkov, K. (2019). The UNITE database for molecular identification of fungi: handling dark taxa and parallel taxonomic classifications. *Nucleic acids research*, 47(D1), D259–D264. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1022>
- Numberger, D., Zoccarato, L., Woodhouse, J., Ganzert, L., Sauer, S., Grossart, H.-P., & Greenwood, A. (2020). Urbanization promotes specific bacteria in freshwater microbiomes including potential pathogens. <https://doi.org/10.1101/2020.06.26.173328>

O

- Ocampo Cervantes, J.A. (s.f.). Centro de Investigaciones Biológicas y Acuícolas de Cuernavaca CIBAC. Enlaces Xochimilco
- Ockendon, N., Baker, D. J., Carr, J. A., White, E. C., Almond, R. E., Amano, T., Bertram, E., Bradbury, R. B., Bradley, C., Butchart, S. H., Doswald, N., Foden, W., Gill, D. J., Green, R. E., Sutherland, W. J., Tanner, E. V., & Pearce-Higgins, J. W. (2014). Mechanisms underpinning climatic impacts on natural populations: altered species interactions are more important than direct effects. *Global change biology*, 20(7), 2221–2229. <https://doi.org/10.1111/gcb.12559>
- Ohmer, M. E., Cramp, R. L., Russo, C. J., White, C. R., & Franklin, C. E. (2017). Skin sloughing in susceptible and resistant amphibians regulates infection with a fungal pathogen. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03605-z>
- Oksanen, J., Blanchet, F. G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P.R., O'hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens, M.H.H., Wagner, H. and Oksanen, M.J. (2013). Package 'vegan'. *Community ecology package, version*, 2(9), 1-295.
- Onofri S, Barreca D, Selbmann L, Isola D, Rabbow E, Horneck G, de Vera JP, Hatton J, Zucconi L. Resistance of Antarctic black fungi and cryptoendolithic communities to simulated space and Martian conditions. *Stud Mycol*. 2008;61:99-109. doi:10.3114/sim.2008.61.10
- Oseguera, L. A., Alcocer, J., & Villarreal Quintero, E. Y. (2015). Metabolismo lacustre de un lago tropical profundo: ¿ Fuente o sumidero de carbono?. *Hidrobiológica*, 25(3), 391-399.

P

- Parra-Olea, G., O. Flores-Villela y C. Mendoza-Almeralla. (2014). Biodiversidad de anfibios en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, Suplo. 85:S460-S466.
- Passos, L., Garcia, G., & Young, R. (2018). Comparing the bacterial communities of wild and captive golden mantella frogs: Implications for amphibian conservation. *PLOS ONE*, 13(10), e0205652. doi: 10.1371/journal.pone.0205652
- Pétrequin, Pierre (ed.). (1994). *Ocho mil años de la Cuenca de Zacapú: Evolución de los paisajes y primeros desmontes*. Mexico: Centro de estudios mexicanos y centroamericanos. doi: <https://doi.org/10.4000/books.cemca.2340>.
- Picazo, F., Vilmi, A., Aalto, J., Soininen, J., Casamayor, E. O., Liu, Y., Wu, Q., Ren, L., Zhou, J., Shen, J., & Wang, J. (2020). Climate mediates continental scale patterns of stream microbial functional diversity. *Microbiome*, 8(1), 92. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00873-2>
- Pilla, R. M., Williamson, C. E., Adamovich, B. V., Adrian, R., Anneville, O., Chandra, S., Colom-Montero, W., Devlin, S. P., Dix, M. A., Dokulil, M. T., Gaiser, E. E., Girdner, S. F., Hambright, K. D., Hamilton, D. P., Havens, K., Hessen, D. O., Higgins, S. N., Huttula, T. H., Huuskonen, H., ... Zadereev, E. (2020). Deeper waters are changing less consistently than

surface waters in a global analysis of 102 Lakes. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76873-x>

- Poff, N. L., Brinson, M. M., & Day, J. W. (2002). Aquatic ecosystems and global climate change. *Pew Center on Global Climate Change, Arlington, VA*, 44, 1-36.
- Pough, F. H., R. M. Andrews, J. E. Cadle, M. L. Crump, A. H. Savitzky y K. D. Wells. (2001). *Herpetology*, segunda edición. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey. 612 p.
- 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. *Microbial Ecology*, 74(3), 745–756. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-0986-y>
- Price, M. N., Dehal, P. S., & Arkin, A. P. (2010). FastTree 2--approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS one*, 5(3), e9490. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009490>

R

- Ramírez, J. P., & Domínguez, O. (2015). El lago de Pátzcuaro, un lago en decadencia. Ciudad de México: UMSNH. Recuperado de <http://www.sabermas.umich.mx/archivo/secciones-antteriores/articulos/90-numero-12/181-el-lago-de-patzcuaro-un-lago-en-decadencia.html>.
- Rebollar, E., Antwis, R., Becker, M., Belden, L., Bletz, M., & Brucker, R. et al. (2016a). Using “Omics” and Integrated Multi-Omics Approaches to Guide Probiotic Selection to Mitigate Chytridiomycosis and Other Emerging Infectious Diseases. *Frontiers In Microbiology*, 7. doi: 10.3389/fmicb.2016.00068
- Rebollar, E. A., Hughey, M. C., Medina, D., Harris, R. N., Ibáñez, R., and Belden, L. K. (2016b). Skin bacterial diversity of panamanian frogs is associated with host susceptibility and presence of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *ISME J.* 10, 1682–1695. doi: 10.1038/ismej.2015.234
- Rebollar, E., Bridges, T., Hughey, M., Medina, D., Belden, L., & Harris, R. (2019). Integrating the role of antifungal bacteria into skin symbiotic communities of three Neotropical frog species. *The ISME Journal*, 13(7), 1763-1775. doi: 10.1038/s41396-019-0388-x
- Rebollar, E., Martínez-Ugalde, E., & Orta, A. (2020). The Amphibian Skin Microbiome and Its Protective Role Against Chytridiomycosis. *Herpetologica*, 76(2), 167. doi: 10.1655/0018-0831-76.2.167
- Recuero, E., Cruzado-Cortes, J., Parra-Olea, G., & Zamudio, K. R. (2010, August). Urban aquatic habitats and conservation of highly endangered species: the case of *Ambystoma mexicanum* (Caudata, Ambystomatidae). In *Annales Zoologici Fennici* (Vol. 47, No. 4, pp. 223-238). Finnish Zoological and Botanical Publishing Board.
- Ross, A. A., Rodrigues Hoffmann, A., & Neufeld, J. D. (2019). The skin microbiome of vertebrates. *Microbiome*, 7(1), 79. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0694-6>
- RStudio Team (2020). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA. <http://www.rstudio.com/>.
- Ruthsatz, K., Lyra, M., Lambertini, C., Belasen, A., Jenkinson, T., & da Silva Leite, D. et al. (2020). Skin microbiome correlates with bioclimate and *Batrachochytrium dendrobatidis* infection intensity in Brazil’s Atlantic Forest treefrogs. *Scientific Reports*, 10(1). doi: 10.1038/s41598-020-79130-3

S

- Scheele, B. C., Pasmans, F., Skerratt, L. F., Berger, L., Martel, A., Beukema, W., Acevedo, A. A., Burrowes, P. A., Carvalho, T., Catenazzi, A., De la Riva, I., Fisher, M. C., Flechas, S. V., Foster, C. N., Frías-Álvarez, P., Garner, T., Gratwicke, B., Guayasamin, J. M., Hirschfeld, M., Kolby, J. E., Canessa, S. (2019). Amphibian fungal panzootic causes catastrophic and ongoing loss of biodiversity. *Science (New York, N.Y.)*, 363(6434), 1459–1463. <https://doi.org/10.1126/science.aav0379>
- SEMAR. (s.f). Lago de Pátzcuaro, Michoacán. <https://digaohm.semar.gob.mx/cuestionarios/cnarioPatzcuaro.pdf>

- SEMARNAT. (2004a). Ficha Informativa de los Humedales de Ramsar (FIR). : Laguna de Zacapu. <https://rsis.ramsar.org/RISapp/files/RISrep/MX1465RIS.pdf>
- SEMARNAT. (2004b). Ficha Informativa de los Humedales de Ramsar (FIR). Humedales del lago de Pátzcuaro. <https://rsis.ramsar.org/RISapp/files/RISrep/MX1447RIS.pdf>
- SEMARNAT. (2018). Programa de Acción para la Conservación de las Especies: *Ambystoma* spp, SEMARNAT/CONANP, México.
- Sepulveda, J., & Moeller, A. H. (2020). The effects of temperature on animal gut microbiomes. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00384>
- Snodgrass J.W., Bryan A.L., Jr., Burger J. (2000) Development of expectations of larval amphibian assemblage structure in southeastern depression wetlands. *Ecol. Appl.*;10:1219–1229. doi: 10.1890/1051-0761(2000)010[1219:DOEOLA]2.0.CO;2.
- Spivak, A. C., Gosselin, K., Howard, E., Mariotti, G., Forbrich, I., Stanley, R., & Sylva, S. P. (2017). Shallow ponds are heterogeneous habitats within a temperate salt marsh ecosystem. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences*, 122(6), 1371-1384.
- Stefansdottir, L., Solmundsson, J., Marteinsdottir, G., Kristinsson, K., & Jonasson, J. P. (2010). Groundfish species diversity and assemblage structure in Icelandic waters during recent years of warming. *Fisheries Oceanography*, 19, 42–62. doi: 10.1111/j.1365-2419.2009.00527.x
- Strobel, G., & Daisy, B. (2003). Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 67(4), 491–502. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.4.491-502.2003>
- Suárez-Mota, Mario Ernesto, & Téllez-Valdés, Oswaldo. (2014). Red de áreas prioritarias para la conservación de la biodiversidad del Eje Volcánico Transmexicano analizando su riqueza florística y variabilidad climática. *Polibotánica*, (38), 67-93.

T

- Trenberth, K. (2011). Changes in precipitation with climate change. *Climate Research*, 47(1), 123-138. doi: 10.3354/cr00953
- Trombetta, T., Bouget, F.-Y., Félix, C., Mostajir, B., & Vidussi, F. (2022). Microbial diversity in a north western Mediterranean Sea shallow coastal lagoon under contrasting water temperature conditions. *Frontiers in Marine Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.858744>
- Tong, Q., Liu, X.-N., Hu, Z.-F., Ding, J.-F., Bie, J., Wang, H.-B., & Zhang, J.-T. (2019). Effects of captivity and season on the gut microbiota of the brown frog (*Rana dybowskii*). *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01912>

V

- Varela, B., Lesbarrères, D., Ibáñez, R., & Green, D. (2018). Environmental and Host Effects on Skin Bacterial Community Composition in Panamanian Frogs. *Frontiers In Microbiology*, 9. doi: 10.3389/fmicb.2018.00298
- Varga, J., Bui-Marinos, M. P., & Katzenback, B. A. (2019). Frog Skin Innate Immune Defences: Sensing and Surviving Pathogens. *Frontiers in immunology*, 9, 3128. doi: 10.3389/fimmu.2018.03128
- Voyles, J., Berger, L., Young, S., Speare, R., Webb, R., & Warner, J. et al. (2007). Electrolyte depletion and osmotic imbalance in amphibians with chytridiomycosis. *Diseases Of Aquatic Organisms*, 77, 113-118. doi: 10.3354/dao01838

W

- Walls, S. C., Barichivich, W. J., & Brown, M. E. (2013). Drought, deluge and declines: the impact of precipitation extremes on amphibians in a changing climate. *Biology*, 2(1), 399–418. doi: 10.3390/biology2010399.
- Wang, B., Zhang, S.-qin, Dong, J.-li, Li, Y., Jin, Y.-xiao, Xiao, H.-wen, Wang, H.-chao, Fan, S.-jun, & Cui, M. (2022). Ambient temperature structures the gut microbiota of zebrafish to

impact the response to radioactive pollution. *Environmental Pollution*, 293, 118539. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118539>

- Wickham H (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York. ISBN 978-3-319-24277-4, <https://ggplot2.tidyverse.org>.
- Woodhams, D., Vredenburg, V., Simon, M., Billheimer, D., Shakhtour, B., & Shyr, Y. et al. (2014). Symbiotic bacteria contribute to innate immune defenses of the threatened mountain yellow-legged frog, *Rana muscosa*. *Biological Conservation*, 138(3-4), 390-398. doi: 10.1016/j.biocon.2007.05.004
- Woodhams, D., Alford, R., Antwis, R., Archer, H., Becker, M., & Belden, L. et al. (2015). Antifungal isolates database of amphibian skin-associated bacteria and function against emerging fungal pathogens. *Ecology*, 96(2), 595-595. doi: 10.1890/14-1837.1

X

- Xenoulis, P. G., Gray, P. L., Brightsmith, D., Palculict, B., Hoppes, S., Steiner, J. M., Tizard, I., & Suchodolski, J. S. (2010). Molecular characterization of the cloacal microbiota of wild and captive parrots. *Veterinary Microbiology*, 146(3-4), 320-325. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.05.024>

Y

- Ying, S., Zeng, D.-N., Chi, L., Tan, Y., Galzote, C., Cardona, C., Lax, S., Gilbert, J., & Quan, Z.-X. (2015). The influence of age and gender on skin-associated microbial communities in urban and rural human populations. *PLOS ONE*, 10(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141842>

Z

- Zambrano, L., E. Valiente y M.J. Vander Zanden. (2010). Food web overlap among native axolotl (*Ambystoma mexicanum*) and two exotic fishes: carp (*Cyprinus carpio*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Xochimilco, Mexico City. *Biological Invasions*, 12(9), 3061-3069.
- Zhao, Q., Guo, Y., Ye, T., Gasparrini, A., Tong, S., Overcenco, A., Urban, A., Schneider, A., Entezari, A., Vicedo-Cabrera, A. M., Zanobetti, A., Analitis, A., Zeka, A., Tobias, A., Nunes, B., Alahmad, B., Armstrong, B., Forsberg, B., Pan, S.-C., ... Li, S. (2021). Global, regional, and national burden of mortality associated with non-optimal ambient temperatures from 2000 to 2019: A three-stage modelling study. *The Lancet Planetary Health*, 5(7). [https://doi.org/10.1016/s2542-5196\(21\)00081-4](https://doi.org/10.1016/s2542-5196(21)00081-4)