

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

ESCUELA DE POSGRADO



TESIS DE MAESTRO EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN

BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL MICROBIOMA DE LA
PIEL DE LA RANA *Epipedobates anthonyi***

Br. CARLO ELIO ELÍAS LAMADRID

TUMBES, PERÚ

2019

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
ESCUELA DE POSGRADO



TESIS DE MAESTRO EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN
BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL MICROBIOMA DE LA
PIEL DE LA RANA *Epipedobates anthonyi*

Br. CARLO ELIO ELÍAS LAMADRID

TUMBES, PERÚ

2019

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

Yo, CARLO ELIO ELÍAS LAMADRID, declaro que los resultados reportados en esta tesis son producto de mi trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a su concepción y análisis. Asimismo declaro (hasta donde tengo conocimiento) no contiene material previamente publicado o escrito por otra persona excepto al que se reconoce como tal a través de citas bibliográficas y con propósitos exclusivos de ilustración o comparación. En este sentido, afirmo que cualquier información presentada sin citar a un tercero es de mi propia autoría. Declaro, también que, en cuanto a la concepción y al estilo de la presentación o a la expresión escrita, la redacción de esta tesis es producto de mi propio trabajo con la dirección y apoyo de mis asesores de tesis y jurado calificador.



Br. Carlo Elio Elías Lamadrid

ACTA DE REVISIÓN Y DEFENSA DE TESIS



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
ESCUELA DE POSGRADO
Tumbes - Perú

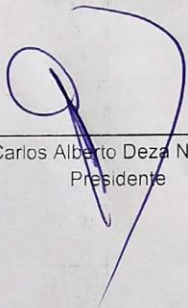
ACTA DE SUSTENTACION DE TESIS

En Tumbes, a los diecisiete días del mes de noviembre del año dos mil dieciocho, a las 12.00 horas, en el Auditorium de la Escuela de Posgrado, se reunieron los miembros del jurado designados con Resolución Directoral N° 076-2018/UNTUMBES-EPG-D; Dr. Carlos Alberto Deza Navarrete - Presidente; Dr. Enrique Edison Benites Juárez - Secretario; Ph. D. Eric Louis Mialhe Matonnier, - Vocal y con Resolución Directoral N° 0166-2018/UNTUMBES-EPG-D, se fijó la fecha de sustentación y defensa de la tesis: Caracterización molecular del microbioma de la piel de la rana *Epipedobates anthonyi*, presentada por el egresado del Programa de Maestría en Biotecnología Molecular Br. Carlo Elio Elías Lamadrid, asesorado por la Ph. D. Virna Alexia Cedeño Escobar.


Concluida la exposición y sustentación, absueltas las preguntas y efectuadas las observaciones, lo declaran: SOBRESALIENTE, dando cumplimiento al Art. 29° del Reglamento de Investigación con fines de Graduación en la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional de Tumbes.

Siendo las 12:40 horas, se dio por concluido el acto académico, y dando conformidad se procedió a firmar la presente acta en presencia del público.

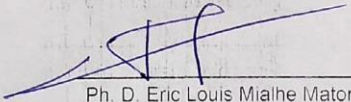
Tumbes, 17 de noviembre de 2018.



Dr. Carlos Alberto Deza Navarrete
Presidente



Dr. Enrique Edison Benites Juárez
Secretario



Ph. D. Eric Louis Mialhe Matonnier
Vocal

C.c. Jurado de Proyecto de Tesis (3), Asesor (1), sustentante (1), UI (2)

RESPONSABLES

RESPONSABLES

Br. Carlo Elio Elias Lamadrid

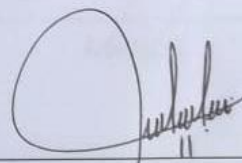
Dr. Jimmy Escobar López Torres



EJECUTOR

Dr. Eric Luis Muñoz Martínez

Ph.D. Virna Alexia Cedeño Escobar

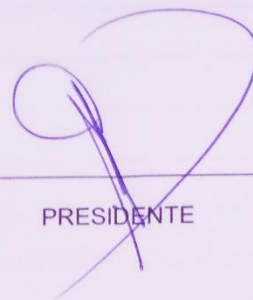


ASESOR

JURADO DICTAMINADOR

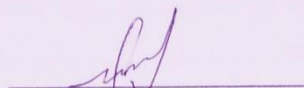
JURADO DICTAMINADOR

Dr. Carlos Alberto Deza Navarrete



PRESIDENTE

Dr. Enrique Edison Benites Juárez



SECRETARIO

Ph.D. Eric Louis Mialhe Matonnier



VOCAL

CONTENIDO

	Página
AFILIACIÓN INSTITUCIONAL DE LOS AUTORES	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUCCIÓN.....	12
2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	15
2.1. Material Biológico.	15
2.2. Toma de muestra de la piel.	15
2.3. Caracterización genómica del microbioma cultivable.	15
2.3.1. Aislamiento y purificación bacteriana.....	15
2.3.2. Extracción de ADN genómico bacteriano.....	16
2.3.3. PCR amplificación del gen 16S ARNr.	16
2.4. Caracterización metagenómica del microbioma.	17
2.4.1. Extracción de ADN metagenómico.	17
2.4.2. Metagenómica dirigida al gen ARNr 16S.	18
3. RESULTADOS.	19
3.1. Aislamiento e identificación genómica del microbioma cultivable.....	19
3.2. Identificación y análisis metagenómico del microbioma.	20
3.2.1. Análisis metagenómico comparativo a nivel de phylum.	20
3.2.2. Análisis metagenómico comparativo a nivel de género.	25
4. DISCUSIÓN.....	30
5. CONCLUSIONES.....	35
6. RECOMENDACIONES.....	36
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	37
8. ANEXOS.....	42

AFILIACIÓN INSTITUCIONAL DE LOS AUTORES

Caracterización molecular del microbioma de la piel de la rana

Epipedobates anthonyi

Molecular characterization of skin microbiome of the frog

Epipedobates anthonyi

Carlo Elías^{1,2*}, Virna Cedeño^{1,2}, Fredy Fabián^{1,2,3}, Lourdes Vásquez^{1,2,3}, Laura Sanjinez^{1,2}

1. Universidad Nacional de Tumbes, Perú.
2. Laboratorio de biotecnología molecular, Inca Biotec' SAC. Tumbes, Perú.
3. Cooperativa de trabajadores, BIOTECOOP. Tumbes, Perú.

*Autor para correspondencia

Email Carlo Elías: cae.lamadrid@gmail.com

Citación:

Elías C., V. Cedeño, F. Fabián, L. Vásquez, L. Sanjinez, 2018. Caracterización molecular del microbioma de la piel de la rana *Epipedobates anthonyi*. Revista peruana de biología (2018) doi: <http://...>

Información sobre los autores:

CE, VC y FF diseño de estudio. LV y LS metodología en laboratorio y trabajo de campo.

Los autores no incurren en conflictos de intereses.

Fuentes de financiamiento:

Universidad Nacional de Tumbes y CONCYTEC según convenio N° 000190-2015-FONDECYT.

RESUMEN

La piel de los vertebrados alberga una diversidad de microorganismos simbióticos que desempeña un papel clave en la supervivencia de los animales. En anfibios, las comunidades microbianas simbióticas están estrechamente relacionadas con la resistencia a enfermedades. En el Perú, el 22.3 % de las 599 especies de anfibios registradas para el país han sido incluidas en alguna categoría de amenaza y otras han desaparecido junto con su información genética. Este estudio tuvo como objetivo caracterizar por primera vez el microbioma de la piel la rana venenosa *Epipedobates anthonyi* (Dendrobatidae) en la Reserva de Biosfera del Noroeste Amotapes - Manglares. Las comunidades bacterianas fueron evaluadas usando técnicas cultivables con secuenciación parcial del gen de ARNr 16S, y técnicas independientes de cultivo usando la metagenómica a través de la secuenciación de próxima generación (NGS). Las bacterias caracterizadas fueron agrupadas en OTUs. De esta manera se logró aislar e identificar 4 especies bacterianas cultivables: 2 probióticos (*Bacillus subtilis* y *Lactococcus garvieae*), el patógeno *Bacillus cereus* y un *Bacillus* sp. El análisis metagenómico tomando en cuenta phylum y género, logró evidenciar que en general los ejemplares silvestres poseen una mayor diversidad respecto de sus pares mantenidos en cautiverio. A nivel de phylum el OTU predominante para todas las muestras fue Proteobacteria mientras que a nivel de género los que predominan están repartidos entre Acinetobacter, Nocardioideis y Rhizobium.

Palabras clave: Bacterias, *Epipedobates anthonyi*, microbioma, metagenómica, Next Generation Sequencing, probióticos, Reserva de Biosfera.

ABSTRACT

The skin of vertebrates contains a diversity of symbiotic microorganisms that plays a key role in the survival of animals. In amphibians, symbiotic microbial communities are closely related to disease resistance. In Peru, 22.3 % of the 599 species of amphibians registered for the country have been included in some category of threat and others have disappeared along with their genetic information. The objective of this study was to characterize for the first time the skin microbiome of the poison frog *Epipedobates anthonyi* (Dendrobatidae) in the Reserva de Biosfera del Noroeste Amotapes - Manglares. Bacterial communities were evaluated using cultivable techniques with 16S rRNA gene partial sequencing, and culture independent techniques using metagenomics through next generation sequencing (NGS). The characterized bacteria were grouped into OTUs. In this way 4 cultivable bacterial species: 2 probiotics (*Bacillus subtilis* and *Lactococcus garvieae*), the pathogen *Bacillus cereus* and one *Bacillus* sp. The metagenomic analysis taking into account phyla and genus, the tests are showed, in general, wild specimens have a greater diversity with respect to their pairs kept in captivity. At the level of phylum, the predominant OTU for all samples was Proteobacteria, while at the genus level they predominate are distributed among Acinetobacter, Nocardioideas and Rhizobium.

Keywords: Bacterial, *Epipedobates anthonyi*, microbiome, metagenomic, Next Generation Sequencing, probiotics, Biosphere Reserve.

1. INTRODUCCIÓN.

Los anfibios en estado silvestre son importantes en la biodiversidad. Sin embargo soportan factores negativos como el cambio climático, invasión de especies no nativas, sobreexplotación, degradación de hábitats e incremento de susceptibilidad frente a nuevos patógenos (Stuart *et al.*, 2004; Skerratt *et al.*, 2007; Bresciano *et al.*, 2015; Costa *et al.*, 2016).

En el Perú, aproximadamente 134 (22.3 %) de las 599 especies reportadas de anfibios se encuentra bajo alguna categoría de amenaza según la lista roja de especies amenazadas de la IUCN. Esta lista actualmente incluye en la categoría 'Casi Amenazada' a la rana venenosa *Epipedobates anthonyi* (Dendrobatidae), una especie representativa de la Reserva de Biosfera del Noroeste Amotapes - Manglares del Perú, que está distribuida en las regiones de Tumbes, Piura y Ancash (Coloma *et al.*, 2015; SERFOR, 2018).

En vertebrados, la piel es la cubierta externa suave que interactúa con el ambiente como primera línea de defensa contra factores externos (Federici *et al.*, 2015). En anfibios, el paso de la vida acuática a la terrestre condujo a que la piel juegue un papel clave en la respiración, pigmentación, osmoregulación, termorregulación, comunicación química, y defensa contra patógenos y sustancias peligrosas. Este tejido, está formado por una capa de mucosa que permite albergar especies microbianas simbióticas y proporciona ventajas para el animal asociado (Antwis *et al.*, 2014; Federici *et al.*, 2015).

El microbioma natural del huésped lo constituyen tales comunidades microbianas en conjunto y está compuesta principalmente por bacterias además de hongos, arqueas y virus (Schommer y Gallo, 2013; Walke *et al.*, 2014). Todos los animales tienen una gran diversidad de estos microorganismos, los cuales cumplen roles importantes para los procesos biológicos del mismo hospedero (Becker *et al.*, 2014).

La presencia de estos microorganismos convierte a la piel en un complejo ecosistema de interacciones con compuestos activos como anticuerpos del sistema inmune innato, metabolitos y péptidos antimicrobianos (Rollin-Smith *et al.*, 2011).

Los péptidos antimicrobianos constituyen un sistema de defensa en diferentes organismos (Tonarelli y Simoneta, 2103). Anteriormente, se han descubierto péptidos naturales generados por bacterias denominados bacteriocinas que representan una línea de acción contra otros microorganismos (Corrales-García y Ciro, 2010). Principalmente, estas moléculas de interés son obtenidas a partir de bacterias ácido-lácticas (BAL) con un espectro de inhibición más amplio que las bacteriocinas sintetizadas por bacterias Gram- negativas (Nes *et al.*, 2007; Corrales-García y Ciro, 2010). Para la obtención de dichas biomoléculas se requiere del uso de técnicas tradicionales como la extirpación de pieles a partir de anfibios sacrificados; además, investigaciones en *E. anthonyi* reportan la presencia de epibatidina, un alcaloide analgésico no-opioides aislado a partir de este tejido y con estas técnicas (Daly *et al.*, 2005; Umile *et al.*, 2014).

Estudios iniciales del microbioma de la piel de anfibios se centraron en el cultivo y aislamientos individuales de bacterias para evaluar propiedades antimicrobianas. Estudios recientes utilizan herramientas biotecnológicas basadas en las ómicas y la bioinformática para la comprensión de la biología de un organismo (Yates, 2000). Las técnicas independientes de cultivo han permitido ampliar el conocimiento de la diversidad y función de la comunidad bacteriana. La secuenciación de próxima generación (Next-Generation Sequencing) permite una descripción completa de las comunidades microbianas con la secuenciación del gen 16S de ARN ribosomal (16S rRNA) (Federici *et al.*, 2015; Medina *et al.*, 2017).

Este estudio constituye el primer reporte para el país cuyo objetivo es caracterizar molecularmente el microbioma cultivable y no cultivable de la piel de *Epipedobates anthonyi*, estableciendo un aporte para el desarrollo de su manejo *in vivo* así como para contribuir con la conservación de esta especie en beneficio de la biodiversidad.

2. MATERIAL Y MÉTODOS.

2.1. Material Biológico.

Se trabajó con un total de 20 individuos adultos de *E. anthonyi*, colectados en el Parque Nacional Cerros de Amotape (Quebrada Huarapal). Los ejemplares se dividieron en dos grupos de 10 individuos cada uno (5 hembras y 5 machos). El primer grupo fue para la evaluación en estado silvestre y el segundo para la evaluación en cautiverio. Los animales en cautiverio fueron mantenidos en terrarios de 5 individuos cada uno (un terrario de 2♂:3♀ y uno de 3♂:2♀) en instalaciones anexas del laboratorio Inca Biotec' S.A.C.; simulando sus condiciones naturales, con una nutrición diaria basada en *Drosophila* sp. "mosca de la fruta" y periódica con crías de *Acheta* sp. "grillo doméstico" y "colémbolos".

2.2. Toma de muestra de la piel.

Los procedimientos se realizaron utilizando guantes de nitrilo estériles. Cada anfibio fue muestreado de acuerdo al protocolo descrito por Lauer *et al.* (2008) con algunas modificaciones. Cada animal fue lavado con 50 mL de agua destilada estéril utilizando una jeringa. Para la obtención del microbioma de la piel, cada espécimen fue frotado con un hisopo de punta de algodón estéril en la zona dorsal, ventral y lateral, los hisopos se guardaron en tubos conteniendo medio de transporte o de cultivo estéril, dependiendo del componente de estudio. Los especímenes fueron liberados después del procedimiento.

2.3. Caracterización genómica del microbioma cultivable.

2.3.1. Aislamiento y purificación bacteriana.

Se trabajó con el total de las muestras de hisopado de la piel de los anfibios.

Cada hisopo fue colocado en tubos Falcon conteniendo caldo Man Rogosa Sharpe (MRS) pH 6.2 y luego estos fueron incubados a 37 °C por 48 h. Las muestras fueron diluidas en serie hasta 10^{-4} y 70 μ L fueron dispensados en placas conteniendo agar MRS que fueron incubadas a 37 °C hasta por 48 h. Las colonias obtenidas fueron seleccionadas de acuerdo a su morfología, color y tamaño, y posteriormente subcultivadas para su purificación.

Las bacterias puras fueron confirmadas mediante tinción de Gram y sembradas por duplicado: un grupo para conservar a -20 °C con 15 % (V:V) de glicerol y el otro para la extracción de su ADN genómico.

2.3.2. Extracción de ADN genómico bacteriano.

Se procedió a tomar 1.2 mL de caldo conteniendo la cepa bacteriana y se microcentrifugó a 10 000 rpm por 2 min. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 500 μ L de solución PBS 1X estéril. El nuevo sedimento de bacterias fue diluido en 200 μ L de la solución TE (1 M Tris/0.1 M EDTA), se llevó a ebullición por 10 min y luego se colocó inmediatamente sobre hielo por 5 min (shock térmico). Posteriormente se centrifugó a 10 000 rpm por 1 min y el sobrenadante fue transferido a otro microtubo donde se realizó un tratamiento con 1 μ L de ARNasa por una hora a 37 °C seguido de una incubación a 65 °C por 15 min y almacenamiento a -20 °C.

2.3.3. PCR amplificación del gen 16S ARNr.

La amplificación del gen ARNr 16S fue realizada mediante la técnica de PCR convencional.

La amplificación del gen 16S se realizó con el juego de iniciadores universales 16S rDNA 27F (AGAGTTTAGTCMTGGCTCAG) y 16S rDNA 1492R (GGYTACCTTGTTACGACTT). La programación del termociclador fue: 1 ciclo a 94 °C por 5 min, seguido de 35 ciclos a 94 °C por 30 s, 58 °C por 45 s, 72 °C por 90 s, y 1 ciclo final a 72 °C por 6 min y 4°C por 10 h. Los amplicones fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % en TAE 1X, para comparar el tamaño con un control positivo de amplificación del gen 16S ARNr antes del envío a secuenciar.

Los productos de PCR obtenidos se secuenciaron con el juego de primers 16S rDNA F518: (CCAGCAGCCGCGGTAATACG), y 16S rDNA R800: (TACCAGGGTATCTAATCC). Las secuencias fueron analizadas comparativamente con las bases de secuencias de GeneBank (National Center for Biotechnology Information) usando el algoritmo BLAST.

2.4. Caracterización metagenómica del microbioma.

2.4.1. Extracción de ADN metagenómico.

El ADN metagenómico fue extraído a partir 4 muestras representativas de hisopado utilizando el MoBio Power Soil DNA Extraction Kit ® (Mobio Laboratories, Carlsbad, CA, USA). Los hisopos fueron cargados directamente en los bead tubes. El procedimiento de extracción restante fue realizado de acuerdo al protocolo descrito con ajustes menores para muestras con baja cantidad de ADN descrita en Kueneman *et al.* (2013) que incluyó dejar sentar la solución C6 en el filtro por 5 min.

2.4.2. Metagenómica dirigida al gen ARNr 16S.

El ADN del microbioma extraído a partir de los hisopos fue utilizado para amplificar el gen del ARNr 16S utilizando la Hot Start Taq Master Plus (Qiagen EE. UU) con los primers universales 27F y 1492R. Las condiciones de PCR fueron: desnaturalización de 5 min a 95 °C, amplificación por 30 ciclos de 30 s a 94 °C, hibridación de 1 min a 56 °C, extensión de 1 min a 72 °C y una extensión final de 6 min a 72 °C. Los amplicones fueron cuantificados y se comprobó su integridad en una electroforesis en gel de agarosa.

El ADN metagenómico fue enviado a secuenciar, mediante la técnica de alto rendimiento de secuenciación de próxima generación (Next Generación Sequencing, NGS). La amplificación fue dirigida a la región V4 del gen 16S ARN. Los datos obtenidos a partir de la secuenciación fueron procesados mediante el análisis específico de propiedad de MR DNA.

Las secuencias generadas por ILLUMINA fueron procesadas y analizadas utilizando el software QIIME Versión 1.9.1 (Caporaso *et al.*, 2011). Las secuencias con puntajes de calidad \geq Q30 y longitud \geq 200 fueron filtradas y con el comando usearch61 se detectaron las secuencias quiméricas (Edgar *et al.*, 2011), Las secuencias no quiméricas fueron asignadas en unidades taxonómicas operacionales (OTUs) con un 97 % de identidad a la base de datos SILVA v128 (<https://www.arb-silva.de/>) para la identificación taxonómica de bacterias. Los OTUs menores a 0,005% fueron filtrados (Bokulich *et al.*, 2013).

3. RESULTADOS.

3.1. Aislamiento e identificación genómica del microbioma cultivable.

Se aislaron un total de 13 cepas bacterianas a partir de la piel de las zonas dorsal, ventral y lateral (cabeza-cloaca y muslos) de 20 individuos adultos (10 en estado silvestre y 10 en cautiverio). Las bacterias fueron Gram-positivas. La identificación fue realizada mediante el secuenciamiento parcial dirigido al gen 16S ARNr.

Las cepas aisladas a partir de individuos en cautiverio fueron consideradas como: *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus* sp.; y la cepa aislada a partir de individuos en silvestres fue *Lactococcus garvieae*. Todas las cepas presentaron una homología superior al 99 % con cepas de referencia del banco de datos de secuencias BLAST (Tabla 1).

Tabla 1. Identificación de bacterias aisladas de la piel de adultos de *E. anthonyi* mediante secuenciamiento parcial del gen 16S ARNr.

CÓDIGO	BACTERIA	% IDENTIDAD	N° ACCESSION
EH51	<i>Bacillus cereus</i> strain VBN13	99 %	MG027666.1
EH52	<i>Bacillus subtilis</i> strain CHAPGPBS-076B	100 %	KY495216.1
EH53	<i>Bacillus</i> sp.	99 %	MG814015.1
EH54	<i>Bacillus subtilis</i> strain CHAPGPBS-076B	100 %	KY495216.1
F22	<i>Bacillus cereus</i> strain MLY1	100 %	CP024655.1
F32	<i>Lactococcus garvieae</i> strain JCM12256	99 %	LC145570.1
F33	<i>Lactococcus garvieae</i> strain PYK22	99 %	MF582349.1
F36	<i>Lactococcus garvieae</i> strain PYK22	100 %	MF582349.1
RM22	<i>Bacillus cereus</i> strain CGAPGPBS-076A	100 %	KY495215.1
RM23	<i>Bacillus</i> sp.	100 %	MG814015.1
RM52	<i>Bacillus</i> sp.	100 %	MG814015.1
RM53	<i>Bacillus cereus</i> strain BF-E1	100 %	KY292459.1
RM54	<i>Bacillus</i> sp.	99 %	MG814015.1

3.2. Identificación y análisis metagenómico del microbioma.

El microbioma asociado a la piel de *E. anthonyi* se analizó a partir de 4 individuos adultos, como se detalla a continuación: “Hembra Silvestre” (HS), “Hembra en Cautiverio” (HC), “Macho Silvestre” (MS), “Macho en Cautiverio” (MC). Las secuencias obtenidas fueron ordenadas en OTUs correspondientes a phylum y género. Se realizaron comparaciones de acuerdo a lo siguiente: HS-HC, MS-MC, HS-MS, HC-MC. En general, de acuerdo a la diversidad especies, los individuos silvestres mostraron una mayor riqueza respecto de los mantenidos en cautiverio.

3.2.1. Análisis metagenómico comparativo a nivel de phylum.

A nivel de phylum, las secuencias generadas a partir de la piel de los individuos en estudio se agruparon en 14 phylum mayores a 1.0 %, siendo en todos los casos el Proteobacteria el más abundante. Considerando la microbiota común a las 4 muestras trabajadas, se observa que está constituida por los phylum: Proteobacteria, Acidobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria, Chloroflexi, Planctomycetes, Firmicutes y Thaumarchaeota.

La comparación entre el microbioma de la piel de la hembra silvestre (HS) y la hembra en cautiverio (HC) indica que está compuesto principalmente de Proteobacteria (39.30 % y 42.46 % respectivamente), seguido por Actinobacteria (6.87 % y 16.72 % respectivamente). Existen 9 phylum comunes a ambas muestras, 4 phylum que se encuentran en la hembra silvestre y no en la hembra en cautiverio (Genmatimonadetes, Fibrobacteres, Nitrospirae y Spirochaetae) y 1 menor a 1.0 % en la hembra en cautiverio (Cyanobacteria) (Fig. 1).

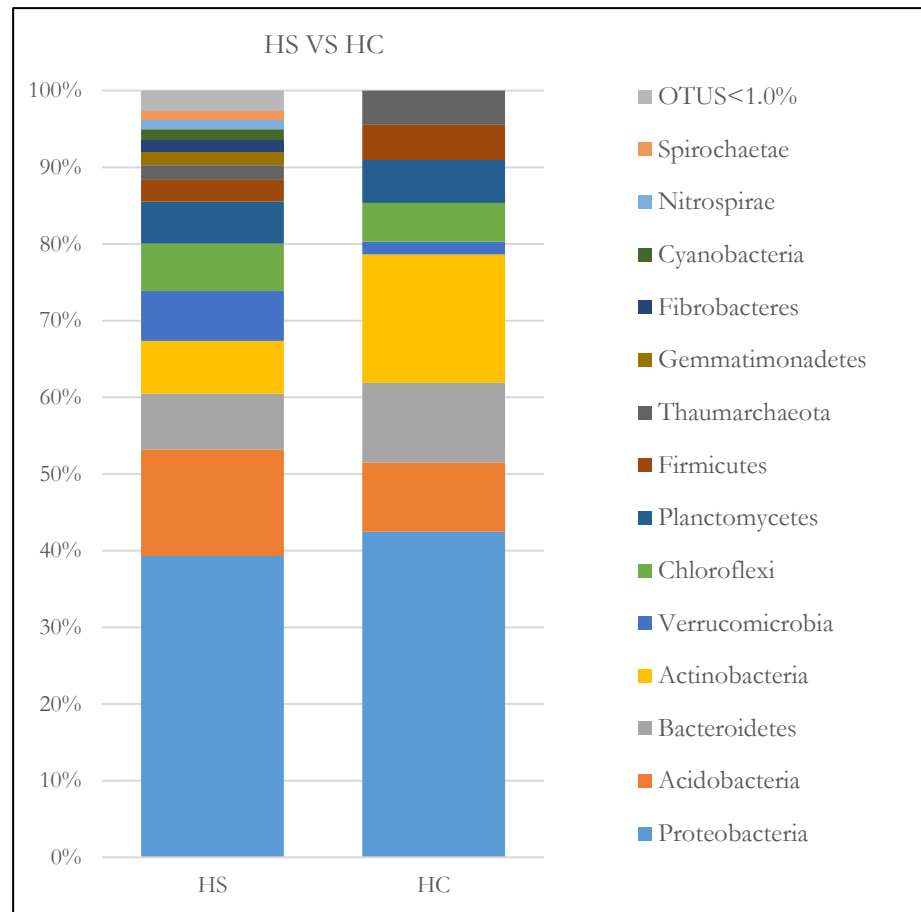


Figura 1. Comparación a nivel de phylum entre el microbioma de la piel de una “hembra silvestre” (HS) y una “hembra en cautiverio” (HC) de *E. anthonyi*.

El microbioma de la piel del macho silvestre (MS) y el macho en cautiverio (MC) está compuesto principalmente de los phylum Proteobacteria (36.34 % y 37.44 % respectivamente), seguido por Bacteroidetes (17.19 % y 8.36 % respectivamente). Existen 8 phylum mayores a 1.0% comunes a ambos individuos, 2 phylum menores a 1.0% en el macho en cautiverio (Verrucomicrobia y Cyanobacteria) y 1 phylum que se encuentra en MS y no en MC (Gemmatimonadetes) (Fig. 2).

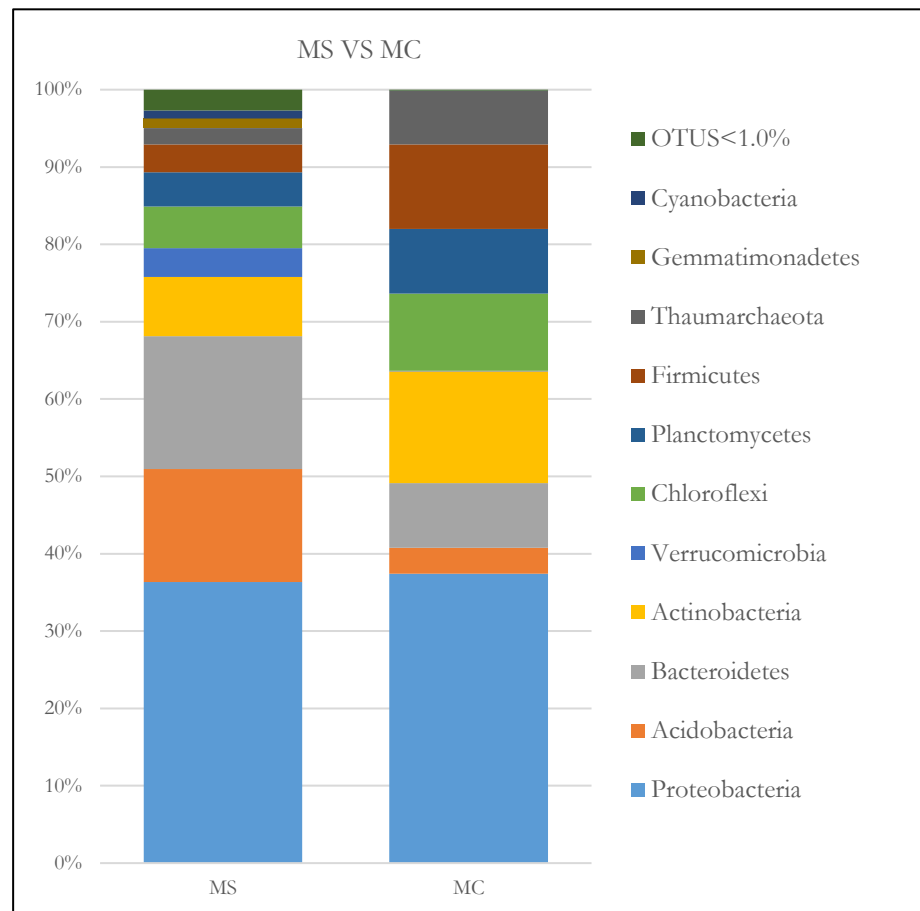


Figura 2. Comparación a nivel de phylum entre el microbioma de la piel de un “macho silvestre” (MS) y un “macho en cautiverio” (MC) de *E. anthonyi*.

La comparación entre la hembra silvestre (HS) y el macho silvestre (MS), muestra un microbioma compuesto principalmente de los phylum Proteobacteria (39.30 % y 36.34 % respectivamente), seguido por Acidobacteria (13.91 % y 14.60 % respectivamente). Ambos individuos comparten 11 phylum mayores a 1.0 %, existiendo 3 phylum que en el caso de MS se encuentran en menor porcentaje. Estos phylum diferenciables son: Fibrobacteres, Nitrospirae y Spirarchaetae (Fig. 3).

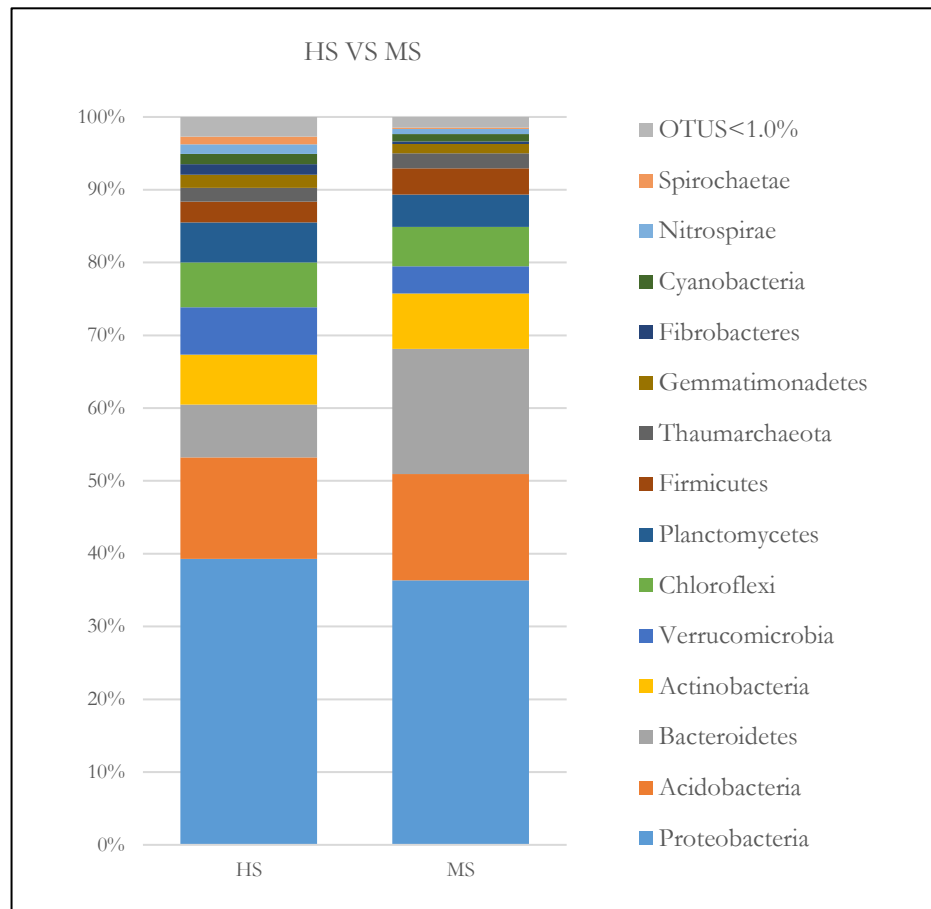


Figura 3. Comparación a nivel de phylum entre el microbioma de la piel de una “hembra silvestre” (HS) y un “macho silvestre” (MS) de *E. anthonyi*.

Al comparar tanto hembra como macho en cautiverio (HC y MC), se aprecia que en ambos el phylum más representativo es Proteobacteria (16.72 % y 14.42 % respectivamente) y Acidobacteria (16.72 % y 14.42 % respectivamente). Ambos individuos comparten 8 phylum mayores a 1.0 %, incluyendo el phylum Verrucomicrobia que en MC es menor al 1 % (Fig. 4).

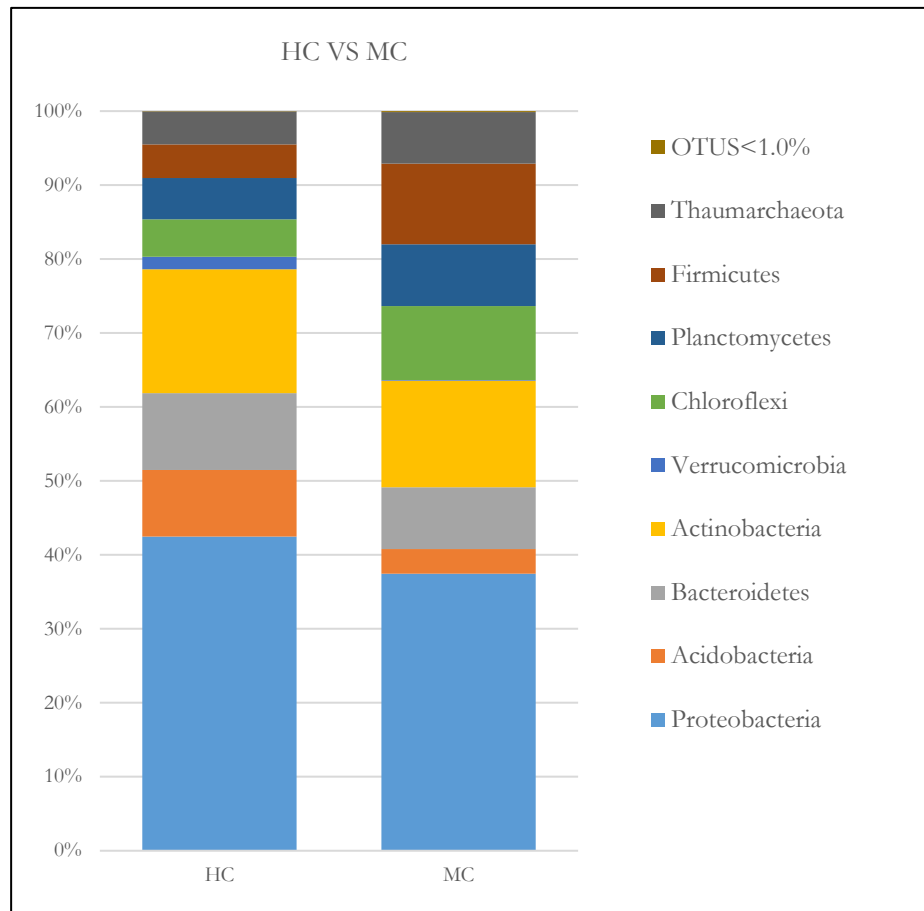


Figura 4. Comparación a nivel de phylum entre el microbioma de la piel de “hembra en cautiverio” (HC) y “macho en cautiverio” (MC) de *E. anthonyi*.

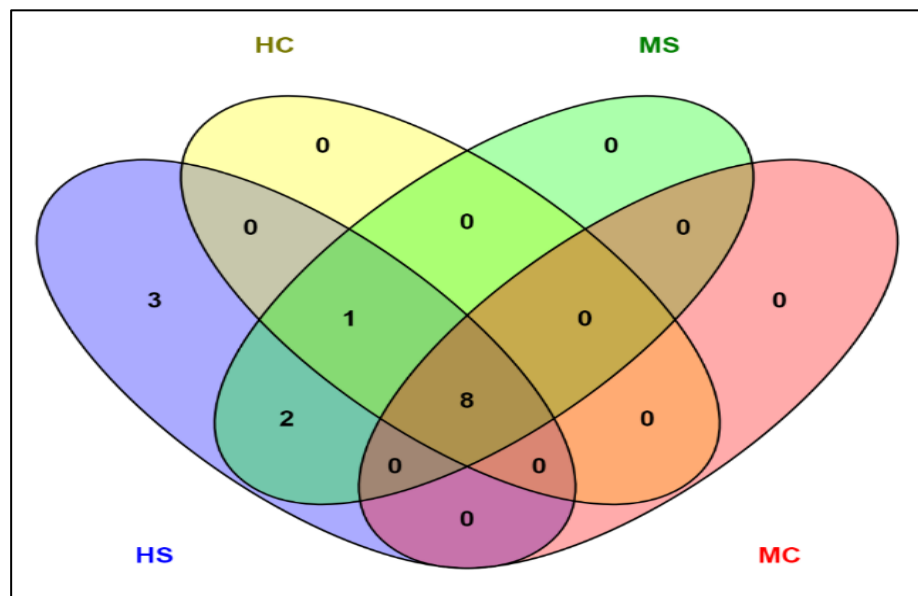


Figura 5. Comparación a nivel de phylum entre el microbioma de la piel de “hembra silvestre” (HS), “hembra en cautiverio” (HC), “macho silvestre” (MS) y “macho en cautiverio” (MC) de *E. anthonyi*.

3.2.2. Análisis metagenómico comparativo a nivel de género.

El análisis a nivel de género del microbioma de la piel de individuos adultos de *E. anthonyi* muestra importantes diferencias de acuerdo al número de secuencias generadas, número de géneros e índice de Shannon-Wiener para la medición de la diversidad. Es posible observar que los individuos que generaron mayor número de secuencias son los que a su vez presentan mayor número de géneros y mayor diversidad (Tabla 2). Esto se corresponde con el análisis de curvas de rarefacción (Fig. 6).

Tabla 2. Análisis de secuencias, número de géneros e índice de diversidad a partir de cuatro muestras de individuos adultos de *E. anthonyi*.

MUESTRA	N° SECUENCIAS	N° GÉNEROS	SHANNON WIENER
HS	5050	247.5	7.626
HC	3538	97.4	5.6
MS	5050	567.6	8.722
MC	3034	92.4	5.586

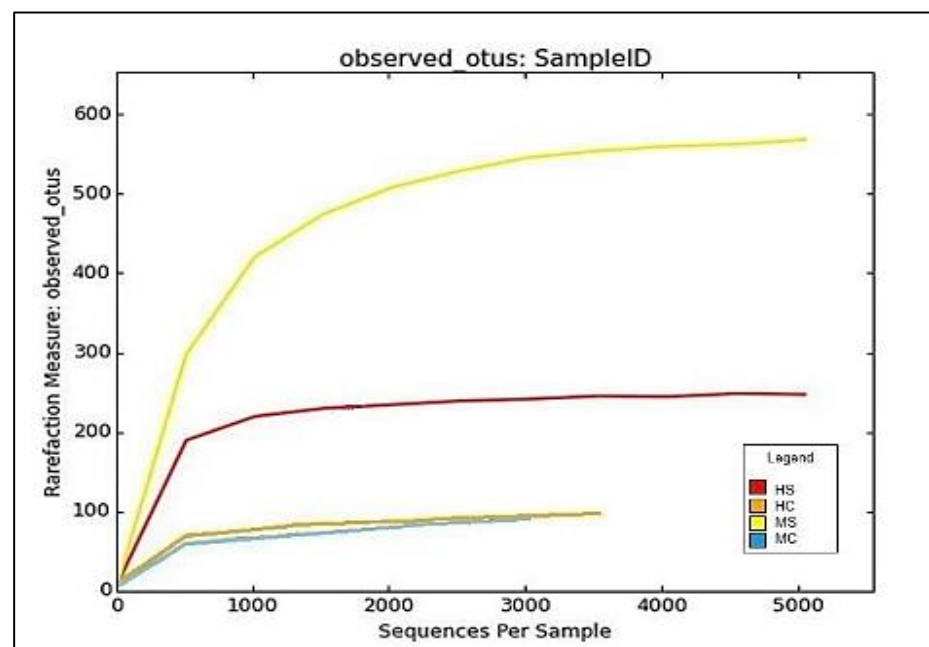


Figura 6. Curvas de rarefacción del microbioma de la piel de *E. anthonyi*. En “X” el número de secuencias por muestra. En “Y” el número de OTUs generados (HS: hembra silvestre; HC: hembra en cautiverio; MS: macho silvestre; MC: macho en cautiverio).

Los resultados a nivel de género indican que las secuencias generadas a partir de la piel de los individuos en estudio se agruparon en 19 géneros mayores a 2.5 %, existiendo varios géneros compartidos y no compartidos.

La comparación entre el microbioma de la piel de la hembra silvestre (HS) y la hembra en cautiverio (HC) indica que está compuesto principalmente de los géneros *Acinetobacter* (2.59 % y 15.71 % respectivamente), seguido por *Flavobacterium* (1.75 % y 6.75 % respectivamente). Los OTUs no cultivables están agrupados en 12.62 % en la hembra silvestre, mientras que en la hembra en cautiverio se agrupan en 16.90 %. Los OTUs < 2.5% existe una diferencia significativa entre hembra silvestre (71.21%) y hembra en cautiverio (42.36 %). Los géneros *Devosia* y *Planctomyces* se encuentran en HS y no en HC; mientras que *Terrabacter* se encuentra en HC y no en HS (Fig. 7).

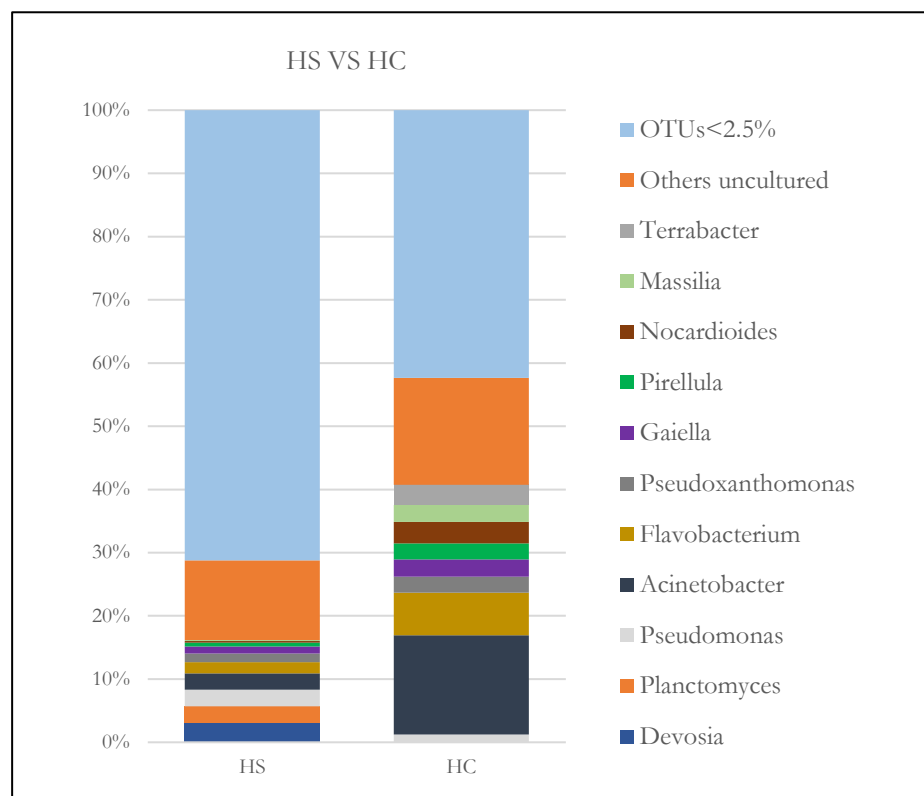


Figura 7. Comparación a nivel de género entre el microbioma de la piel de una “hembra silvestre” (HS) y una “hembra en cautiverio” (HC) de *E. anthonyi*.

El microbioma de la piel del macho silvestre (MS) y el macho en cautiverio (MC) está compuesto principalmente de los géneros Nocardioides (0.39 % y 5.11 % respectivamente), seguido por Bradyrhizobium (2.60 % y 2.86 % respectivamente). Los OTUs no cultivables se agrupan en 14.52 % en el macho silvestre, mientras que en el macho en cautiverio representan el 28.01 %. Respecto a los OTUs < 2.5% existe una diferencia significativa entre el macho silvestre (70.42 %) y el macho en cautiverio (45.26 %).

Se observa además que el género Mucilaginibacter se encuentran en MS y no en MC; mientras que los géneros Rhodoplanes y Conexibacter se encuentran en MC y no en MS (Fig. 8).

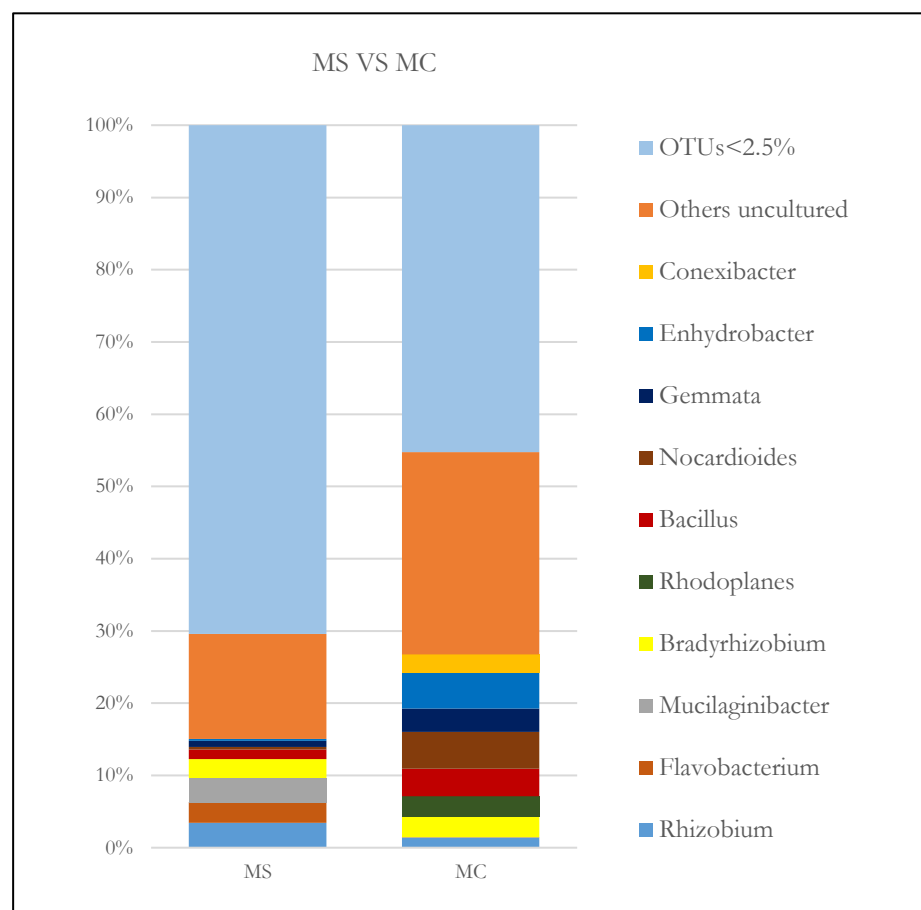


Figura 8. Comparación a nivel de género entre el microbioma de la piel de un “macho silvestre” (MS) y un “macho en cautiverio” (MC) de *E. anthonyi*.

La comparación entre la hembra silvestre (HS) y el macho silvestre (MS), muestra un microbioma compuesto principalmente de los géneros *Rhizobium* (2.36 % y 3.46 % respectivamente), seguido por *Devosia* (13.91 % y 14.60 % respectivamente). Los OTUs no cultivables se agruparon en 12.62 % en HS, mientras que en MS representan el 14.52 %.

Respecto a los OTUs < 2.5 % no se aprecia diferencia significativa entre hembra silvestre (69.84 %) y macho silvestre (70.15 %). Se observa además que HS y MC comparten 8 géneros (Fig. 9).

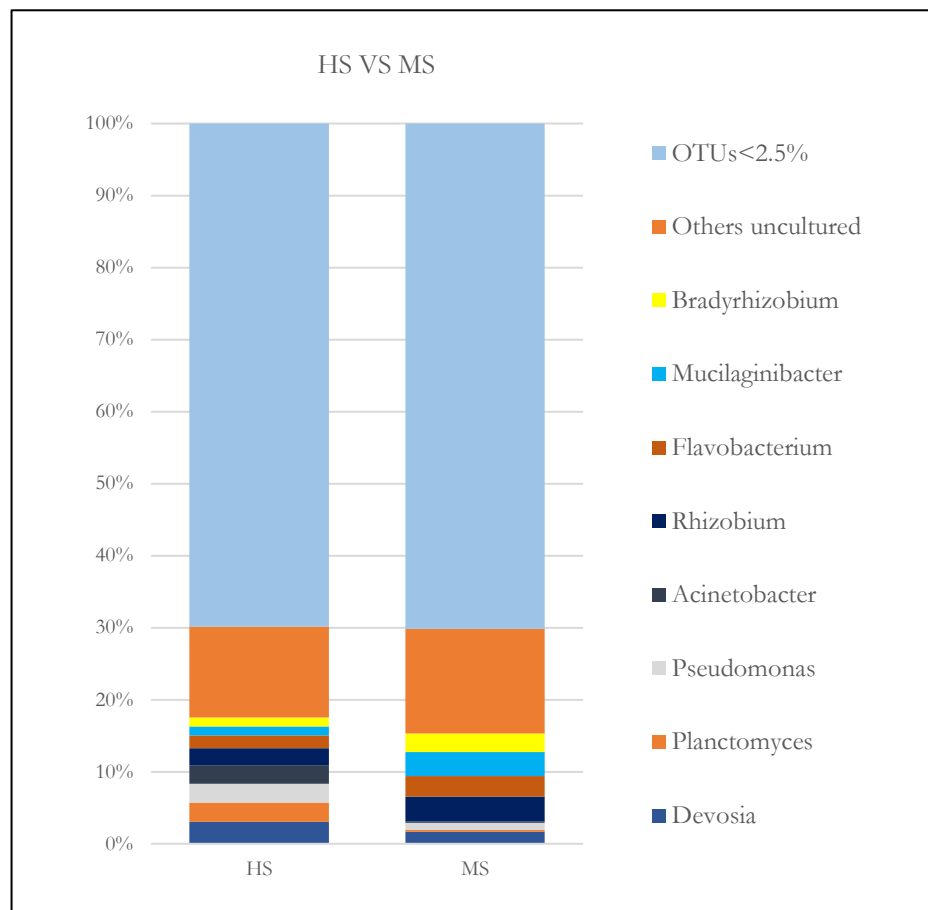


Figura 9. Comparación a nivel de género entre el microbioma de la piel de una “hembra silvestre” (HS) y un “macho silvestre” (MS) de *E. anthonyi*.

Al comparar tanto hembra como macho en cautiverio (HC y MC), se aprecia que en ambos el género más representativo es *Acinetobacter* (15.71 % y 0.09 % respectivamente) y *Nocardioideis* (3.37 % y 5.11 % respectivamente). Los OTUs no cultivables se agruparon en 16.90 % en la hembra en cautiverio, mientras que en el macho en cautiverio representan el 28.01 %. Respecto a los OTUs < 2.5 % no se aprecia diferencia significativa entre HC (38.43 %) y MC (46.59 %).

Se observa además que los géneros *Pseudoxanthomonas*, *Gaiella*, *Pirerulla*, *Massilia* y *Terrabacter* están en HC y no en MC; mientras que los géneros *Rhodoplanes* y *Conexibacter* están en MC y no en HC (Fig. 10).

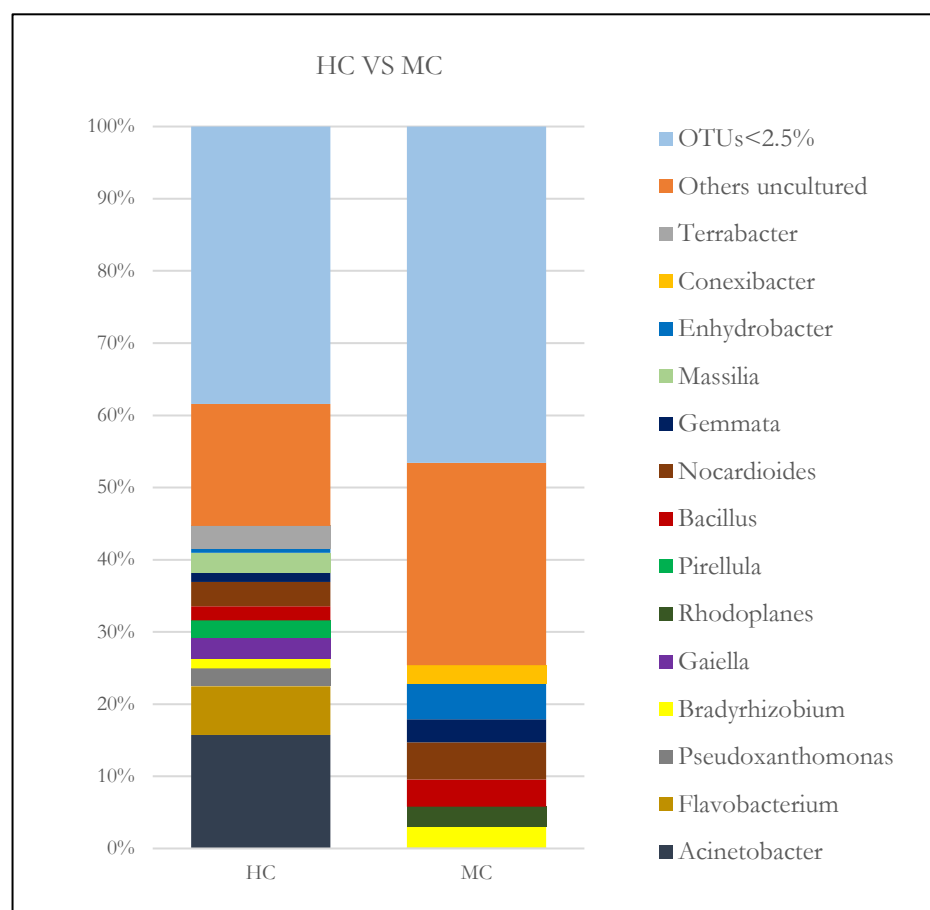


Figura 10. Comparación a nivel de género entre el microbioma de la piel de una “hembra en cautiverio” (HC) y un “macho en cautiverio” (MC) de *E. anthonyi*.

4. DISCUSIÓN.

Este estudio se ha enfocado en la caracterización del microbioma de la piel de la rana *E. anthonyi* mediante la optimización de herramientas moleculares tales como la secuenciación del gen 16S ARNr, siendo uno de los primeros estudios aplicados a anfibios el realizado por McKenzie *et al.* (2012) que señala que el uso de estas nuevas técnicas de alta eficiencia permite observar la composición y abundancia relativa de microorganismos con un grado de exactitud mayor que métodos previos utilizados para la misma finalidad.

En esta investigación, el desarrollo del primer componente está relacionado con la caracterización del microbioma cultivable utilizando el secuenciamiento simple de bacterias aisladas a través de medios de cultivos; una reciente tecnología que ha sido aplicada por Roth *et al.* (2013) quien señala que para la identificación molecular de bacterias, el gen 16S ARNr es elegido debido a su capacidad de poseer dominios altamente conservados y una extensa base de datos de referencia.

Las bacterias cultivables que se han logrado aislar corresponden al grupo de bacterias Gram positivas de importancia en acuicultura. Dentro de este grupo, existen varios géneros de que son considerados como probióticos en anfibios y que según Freitas *et al.* (2017) han sido utilizados como promotores de crecimiento y reguladores de la microbiota con efectos inmunomoduladores positivos. En nuestro estudio, estas bacterias fueron identificadas como *Bacillus subtilis* y *Lactococcus garvieae*, además de la patógena *Bacillus cereus* y otro *Bacillus* no identificado (Tabla.1).

Es importante resaltar la presencia de *B. subtilis*, considerada como una bacteria con capacidad probiótica que ha sido reportada y utilizada previamente en ranas toro (*Lithobates catesbeianus*) mostrando efectos en la estimulación del sistema inmune, crecimiento y ganancia de peso a un tiempo prolongado de uso (Franca *et al.*, 2008 y Freitas *et al.* 2017).

Nosotros además reportamos la presencia de *L. garvieae*, una bacteria que está considerada dentro del grupo de bacterias ácido lácticas reconocidas generalmente como seguras. Este género ha sido reportado además en un estudio realizado por Mendoza *et al.* (2012) donde fue aislado junto a otras cepas de bacterias ácido lácticas a partir de la piel de ranas toro (*L. catesbeianus*); siendo utilizada además como una cepa probiótica junto a *Corynebacterium* y *Bacillus* en otro estudio basado en la selección e interacción de bacterias benéficas en el intestino de la rana de azotes *Polypedates megacephalus* (Weng *et al.*, 2017).

El segundo componente de este estudio estuvo enfocado en la caracterización, mediante técnicas independientes de cultivo, del microbioma de la piel de individuos hembras y machos tanto en estado silvestre como en cautiverio, buscando similitudes y diferencias de acuerdo a diversidad y abundancia. En nuestro estudio, la identificación de estos grupos bacterianos estuvo basada en estudios previos sobre caracterización metagenómica del microbioma de la piel de anfibios utilizando la técnica de secuenciación de próxima generación (NGS, Next Generation Sequencing), que proporciona una descripción de las comunidades microbianas con una alta eficiencia en la amplificación y secuenciamiento de la región V4 del gen 16S ARNr (Kueneman *et al.*, 2013; Becker *et al.*, 2014; Federici *et al.*, 2015).

Una investigación en anfibios japoneses realizada por Sabino-Pinto *et al.* (2016) pone en evidencia que la estructura de la comunidad bacteriana cutánea difiere significativamente entre individuos silvestres y cautivos, con una alta diversidad presente en los individuos silvestres y una pérdida considerable en los individuos en cautiverio. Esto toma relevancia respecto a los resultados obtenidos en nuestro estudio ya que el análisis metagenómico muestra que en general, de acuerdo a la diversidad, los dos individuos silvestres mostraron una mayor riqueza respecto de los dos mantenidos en cautiverio, conservando la mayor parte de la composición de la comunidad microbiana. Por tanto, las comunidades microbianas asociadas a anfibios pueden ser alteradas en condiciones de cautiverio pero la mayor parte de la estructura de la comunidad puede ser preservada (Becker *et al.*, 2014).

Las comparaciones entre los cuatro individuos adultos muestran resultados interesantes. A nivel de phylum, las secuencias generadas se agruparon en 14 phylum mayores a 1.0%, siendo en todos los casos el Proteobacteria el más abundante. Considerando la microbiota común a las cuatro muestras trabajadas, se observa que está constituida por los phylum: Proteobacteria, Acidobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria, Chloroflexi, Planctomycetes, Firmicutes y Thaumarchaeota. Estos resultados son consistentes con los hallazgos previos realizados en diferentes estudios en piel de anfibios donde la dominancia está repartida entre Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes y Bacteroidetes (Walke *et al.*, 2014; Federici *et al.*, 2015 y Medina *et al.*, 2017); Acidobacteria y Planctomycetes (Becker *et al.*, 2014 y Bataille *et al.*, 2016).

A nivel de Phylum, todos los individuos estudiados presentan una dominancia de Proteobacteria seguida de Actinobacteria a excepción del macho en cautiverio cuyo segundo phylum más abundante es el Bacteroidetes. Esto coincide con lo encontrado por Federici *et al.* (2015) donde el segundo phylum más abundante de su estudio fue Bacteroidetes que estuvo presente principalmente en ranas cautivas sanas, de la misma manera que lo reporta Becker *et al.* (2014).

La comparación entre el microbioma de la piel de la hembra silvestre (HS) y la hembra en cautiverio (HC) indica que existen 9 phylum que se encuentran en ambos ejemplares, un phylum menor a 1.0 % en HC (Cyanobacteria) y 4 phylum que se encuentran en HS pero no en HC, (Fig. 1). El microbioma de la piel del macho silvestre (MS) y el macho en cautiverio (MC) presenta 8 phylum mayores a 1 % comunes a ambos individuos, dos menores a 1 % en MC (Verrucomicrobia y Cyanobacteria) un phylum que se encuentra en MS y no en MC (Gemmatimonadetes, Fig. 2). La comparación entre la hembra silvestre y el macho silvestre muestra que ambos individuos comparten 11 phylum mayores a 1.0 % y existen tres phylum menores a 1.0 % en MS. (Fig. 3). Al comparar tanto hembra como macho en cautiverio, se aprecia que ambos individuos comparten 8 phylum mayores a 1.0 % y un phylum menor a 1 % en MC (Verrucomicrobia) (Fig. 4).

Estos hallazgos demuestran que existe una alta diversidad en animales silvestres mientras que los cambios en la microbiota de animales durante el manejo en cautiverio podrían ser ocasionados debido a factores ambientales tales como humedad, temperatura y pH (Fig. 5). El estudio de Becker *et al.* (2014) establece que es imposible simular en cautiverio, la variedad de condiciones en microhábitats que poseen los individuos en el campo; mientras que Sabino-Pinto *et al.* (2016) logró demostrar que los cambios en las condiciones de cautiverio reducen la diversidad debido a que se reduce la complejidad ambiental.

Tomando estas referencias, nuestros resultados indican también que las secuencias generadas a partir de la piel de las ranas en estudio, se agruparon en 19 géneros mayores a 2.5 % y se pudo evidenciar que en los cuatro individuos existe una gran cantidad de OTUs menores a 2.5 %; además se aprecia una diferencia significativa entre HS (71.21 %) y HC (42.36 %) así como entre MS (70.42 %) y MC (45.26 %). Por el contrario, no se observa diferencia significativa al comparar HS (69.84 %) con MS (70.15 %); así como al comparar HC (38.43 %) con MC (46.59 %). Estos datos confirman lo antes mencionado respecto de que los ejemplares silvestres poseen un mayor número de OTUs así como un mayor índice de diversidad directamente relacionado al número de secuencias obtenidas (Tabla 2, Fig. 6).

El análisis comparativo entre el microbioma de la piel de la hembra silvestre y la hembra en cautiverio indica que el género más abundante entre ambas, *Acinetobacter*, presenta una considerable diferencia en la abundancia de HS (2.59 %) respecto a HC (15.72 %). No es posible determinar con exactitud el factor causante, sin embargo se debería a que posiblemente HC se encontraba en etapa de preparación al amplexus, por lo que la composición de su microbioma fue alterada. Esto es posible debido a que ciertas especies de *Acinetobacter* son capaces de formar biofilms que proporcionan estructura y protección a comunidades bacterianas en muchos sistemas biológicos (Rebollar *et al.*, 2016). Esto puede ser reforzado por el hecho de que en los individuos machos la presencia de este género fue casi inexistente.

Los géneros *Devosia* y *Planctomyces* se encuentran en HS y no en HC mientras que *Terrabacter* se encuentra en HC y no en HS (Fig. 7). El microbioma de la piel de MS y MC está compuesto principalmente de los géneros *Nocardioide*s seguido de *Bradyrhizobium*. Se observa además que *Mucilaginibacter* se encuentra en MS y no en MC; mientras que *Rhodoplanes* y *Conexibacter* se encuentran en MC y no en MS (Fig. 8). La comparación entre HS y MS muestra un microbioma compuesto principalmente de *Rhizobium* seguido por *Devosia*. Se observa además que HS y MC comparten 8 géneros (Fig. 9). Al comparar tanto HC como MC se observa que *Pseudoxanthomonas*, *Gaiella*, *Pirerulla*, *Massilia* y *Terrabacter* están en HC y no en MC; mientras que *Rhodoplanes* y *Conexibacter* están en MC y no en HC (Fig. 10).

5. CONCLUSIONES.

- La utilización de técnicas dependientes de cultivo tiene como ventaja el establecimiento de un cepario bacteriano mientras que las técnicas independientes de cultivo (metagenómica) permiten la identificación de un extenso número de bacterias tanto cultivables como no cultivables.
- Se logró identificar especies bacterianas aisladas a partir de la piel de *E. anthonyi* correspondientes a los probióticos *Bacillus subtilis* y *Lactococcus garvieae*, el patógeno *Bacillus cereus* y un *Bacillus* no determinado.
- El análisis metagenómico permitió evidenciar que la piel de los individuos silvestres de *E. anthonyi* presentó una mayor diversidad microbiana en relación a los ejemplares mantenidos en cautiverio.
- A nivel de phylum el OTU predominante para todas las muestras fue Proteobacteria mientras que a nivel de género los que predominan están repartidos entre Acinetobacter, Nocardioideas y Rhizobium.

6. RECOMENDACIONES.

- Realizar investigaciones que permitan el análisis del microbioma de la piel de otras especies de anfibios en Áreas Naturales Protegidas.
- Establecer ceparios utilizando técnicas dependientes de cultivo de la piel de anfibios para su evaluación con fines médicos y veterinarios.
- Optimizar tecnologías ómicas para la evaluación independiente de cultivo del microbioma de la piel de anfibios para una caracterización más completa de las comunidades microbianas en ranas silvestres y en cautiverio.
- Estandarizar y optimizar el manejo de ciertas especies de anfibios en cautiverio para fines de valorización, aprovechamiento de recursos genéticos y conservación de la biodiversidad.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Antwis, Rachael, Rachel Haworth, Daniel Engelmoer, Victoria Ogilvy, Andrea Fidgett and Richard Preziosi. 2014. Ex situ Diet influences the bacterial community associated with the skin of red-eyed tree frogs (*Agalychnis callidryas*). *PLoS ONE*, 9(1):e85563.
- Bataille, Arnaud, Larisa Lee-Cruz, Binu Tripathi, Hyoki Kim and Bruce Waldman. 2016. Microbiome variation across amphibian skin regions: implications for chytridiomycosis mitigation efforts. *Microbial ecology*, 71(1), 221-232.
- Becker, Matthew, Corinne Richards-Zawacki, Brian Gratwicke and Lisa Belden. 2014. The effect of captivity on the cutaneous bacterial community of the critically endangered Panamanian golden frog (*Atelopus zeteki*). *Biological Conservation*, 176, 199-206.
- Bokulich, Nicholas, Sathish Subramanian, Jeremiah Faith, Dirk Gevers, Jeffrey Gordon, Rob Knight, David Mills and Gregory Caporaso. 2013. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nature methods*, 10 (1), 57-59.
- Bresciano, Jorge, C Salvador, C Paz-y-Miño, A Parody-Merino, J Bosch, D Woodhams. 2015. Variation in the Presence of Anti-*Batrachochytrium dendrobatidis* bacteria of amphibians across life stages and elevations in Ecuador. *EcoHealth*, 12, 310-319.
- Caporaso, Gregory, Cristian Lauber, William Walters, Donna Berg-Lyons, Catherine Lozupone, Peter Turnbaugh, Noah Fierer, and Rob Knight. 2011. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108 (Supplement 1), 4516-4522.

- Coloma, Luis, Caty Frenkel y Santiago Ron. 2015. *Epipedobates anthonyi*. En Guía dinámica de los anfibios del Ecuador. Amphibia Web Ecuador. Museo de Zoología QCAZ, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito, Ecuador.
- Costa, Sara, Isabel Lopes, Diogo Neves Proenca, Rui Ribero, Paula Morais.. 2016. Diversity of cutaneous microbiome of *Pelophylax perezi* populations inhabiting different environments. *Science of the Total Environment*, 572, 995-1004.
- Corrales-García, Ligia y Gelmy Ciro. 2010. Péptidos con actividad antimicrobiana producidos por microorganismos nativos. *Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*. Universidad de Antioquía, Medellín, Colombia, 17(2):181-190.
- Daly, John, Thomas Spande and Martin Garraffo. 2005. Alkaloids from amphibian skin: a tabulation of over eight-hundred compounds. *Journal of natural products*, 68(10), 1556-1575.
- Edgar, Robert, Brian Haas, Jose Clemente, Cristopher Quince and Rob Knidht. 2011. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*, 27 (16), 2194-2200.
- Federici, Ermano, Roberta Rossi, Laura Fidati, Romina Paracucchi, Silvia Scargetta, Elena Montalbani, Andrea Franzetti, Gianandrea La Porta, Anna Fagotti, Francesca Simonceli, Giovanni Cenci and Ines Di Rosa. 2015. Characterization of the skin microbiota in Italian stream frogs (*Rana italica*) infected and uninfected by a cutaneous parasitic disease. *Microbes and environments*, 30(3), 262-269.

- Franca, Fernanda, Danielle Dias, Patricia Teixeira, Adriana Marcantonio, Marta De Stefani, Antonio Antonucci, Guilherme Da Rocha, Maria Tavares, Claudia Ferreira. 2008. Efeito do probiótico *Bacillus subtilis* no crescimento, sobrevivência e fisiologia de rãs-touro (*Rana catesbeiana*). *Boletim do Instituto de Pesca*, 34(3), 403-412.
- Freitas, Jorgina, Priscila Viau, Claudio Oliviera, Patricia Texeira, Leonardo Tachibana, Danielle Dias, Marcio Hipolito Isabella Bordon, Sthefany Alfaia y Claudia Ferreira. 2017. Effect of dietary supplements in American bullfrogs reared in low and high stocking densities. *Aquaculture Reports*, 8, 45-48.
- Kueneman, Jordan, Laura Parfrey, Douglas Woodhams, Holly Archer, Rob Knight 2013 y Valerie McKenzie. The amphibian skin-associated microbiome across species, space and life history stages. *Molecular ecology*, 23(6), 1238-1250.
- Lauer, Antje, Mary Simon, Jenifer Banning, Briana Lam y Reid Harris. 2008. Diversity of cutaneous bacteria with antifungal activity isolated from female four-toed salamanders. *The ISME journal*, 2(2), 145.
- McKenzie, Valerie, Robert Bowers, Noah Fierer, Rob Knight y Christian Lauber. 2012. Co-habiting amphibian species harbor unique skin bacterial communities in wild populations. *The ISME journal*, 6(3), 588.a.
- Medina, Daniel, Myra Hughey, Matthew Becker, Jenifer Walke, Thomas Umile, Elizabeth Burzynski, Anthony Iannetta, Kevin Minbiole y Lisa Belden. 2017. Variation in metabolite profiles of amphibian skin bacterial communities across elevations in the Neotropics. *Microbial ecology*, 74(1), 227-238.

- Mendoza, Gabriela, Sergio Pasteris, Cesar Ale, María Otero, Marta Buhler y María Nader-Macías. 2012. Cultivable microbiota of *Lithobates catesbeianus* and advances in the selection of lactic acid bacteria as biological control agents in raniculture. *Research in veterinary science*, 93(3), 1160-1167.
- Nes, Ingolf, S Yoon y Dzung Diep. 2007. Ribosomally synthesized antimicrobial peptides (bacteriocins) in lactic bacteria: a review. *Food Since Biotechnology*, 16(5):657-690.
- Rebollar, Eria, Myra Hughey, Daniel Medina, Reid Harris, Roberto Ibáñez y Lisa Belden. 2016. Skin bacterial diversity of Panamanian frogs is associated with host susceptibility and presence of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *The ISME journal*, 10(7), 1682.
- Rollins-Smit, Louise, Jeremy Ramsey, James Pask, Laura Reinert y Douglas Woodhams. 2011. Amphibian immune defenses against chytridiomycosis: impacts of changing environments. *Integr. Comp. Biol.*, 51:552–562.
- Roth, Tara, Janet Foley, Joy Worth, Jonah Piovia-Scott, Karen Pope y Sharon Lawler. 2013. Bacterial flora on Cascades frogs in the Klamath mountains of California. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*. 36(6), 591-598.
- Sabino-Pinto, Joana, Molly Bletz, Mohammed Islam, Norio Shimizu, Sabin Bhujju, Robert Geffers, Michael Jarek, Atsushi Kurabayashi y Miguel Vences. 2016. Composition of the cutaneous bacterial community in Japanese amphibians: effects of captivity, host species, and body region. *Microbial ecology*, 72(2), 460-469.
- Schommer, Nina y Richard Gallo. 2013. Structure and function of the human skin microbiome. *Trends in Microbiology*, 21:660–668.

- Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre (SERFOR). 2018. Libro Rojo de la Fauna Silvestre Amenazada del Perú. Primera edición. SERFOR, Lima, Perú.
- Skerratt, Lee, Lee Berger, Richard Speare, Scott Cashins, Keith McDonald, Andrea Dawn Phillott, Harry Bryan Hines y Nicole Kenyon. 2007. Spread of chytridiomycosis has caused the rapid global decline and extinction of frogs. *EcoHealth*. 4:125–134
- Stuart, Simon, Janice S. Chanson, Neil Cox, Bruce Young, Ana Rodrigues, Debra Fischman y Robert Waller. 2004. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science*, 306:1783–1786.
- Tonarelli, G y A Simoneta. 2013. Péptidos antimicrobianos de organismos procariotas y eucariotas como agentes terapéuticos y conservantes de alimentos (review). *Revista FABICIB*, 17:137-177.
- Umile, Thomas, Patrick McLaughlin, Kendall Johnson, Shaya Honarvar, Alison Blackman, Elizabeth Burzynski, Robert Davis, Thais Teotonio, Gail Hearn, Christine Hughey, Anthony Lagalante y Kevin Minbiole. 2014. Nonlethal amphibian skin swabbing of cutaneous natural products for HPLC fingerprinting. *Anal. Methods*, 6, 3277.
- Walke, Jenifer, Matthew Becker, Stephen Loftus, Leanna House, Guy Cormier, Roderick Jensen y Lisa Belden. 2014. Amphibian skin may select for rare environmental microbes. *The ISME journal*. 8(11), 2207.
- Weng, Francis, Grace Shaw, Chieh-Ying Weng Yi-Ju Yang y Dari Wang. 2017. Inferring microbial interactions in the gut of the Hong Kong whipping frog (*Polypedates megacephalus*) and a validation using probiotics. *Frontiers in microbiology*, 8, 525.
- Yates John. 2000. Mass spectrometry from genomics to proteomics. *Elsevier Science*, 16(1).

8. ANEXOS.

Dedicatoria.

A Dios, por el milagro y la maravilla de la vida.

A Marlene, por darme la oportunidad, por ser incondicional.

A Román, por enseñarme a ser cada vez mejor.

*A Paola, por ser mi fuerza y mi motivación más grande, mi ayuda
idónea; una mujer virtuosa.*

A Jhair, por compartir la mejor pasión... amar la vida.

A Xaly, por su fuerza inquebrantable, por ver una luz nacer.

Esto es para ustedes.

Agradecimientos.

A los docentes del programa de Maestría en Biotecnología Molecular: Ph.D. Eric Mialhe, Ph.D. Virna Cedeño y Ph.D. Emmerik Motte por la oportunidad brindada y por ser nuestros guías en el camino de la ciencia.

A la Universidad Nacional de Tumbes y los coordinadores del programa de Maestría: Dr. Auberto Hidalgo, Dr. Carlos Deza.

Al equipo científico del área de Medicina Veterinaria y Conservación de la Biodiversidad: M Sc. Fredy Fabián, por su asesoramiento; M Sc. Lourdes Vásquez, M Sc. (c). Laura Sanjinez, MV. Víctor Rivera, MV. Jazmín Viera, por su apoyo en toma de muestras y trabajo en laboratorio.

Al equipo técnico de INCA BIOTEC' S. A. C.: Téc. Pedro Masías, Téc. César Chanta, Téc. Petter Baca, M Sc. Max Salvatierra, M Sc. Benoit Diringer y M Sc. Juan Quimi por su asesoría en laboratorio.

Al Concejo Nacional de Ciencia Tecnología e Innovación Tecnológica, CONCYTEC, por las becas de estudios otorgadas en favor de la ciencia.

Al Servicio Nacional de Áreas Naturales Protegidas por el Estado, SERNANP.