17 de mayo de 2026

Comparación de bacterias cutáneas cultivables asociadas a *Adenomera* sp. entre ambientes urbanos y de bosque en la provincia de Napo

Emily Daniela Benavides Buri
UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM

Firma del tutor/a: _____

VESTIGACIÓN | Parroquia Muyuna, kilómetro 7 vía a Alto Tena
INNOVACIÓN | Tena · Napo · Ecuador
EDUCACIÓN | **Telf.:** (06) 370 0040 · (06) 299 9160

www.ikiam.edu.ec
@u_ikiam IkiamOficial u_ikiam Universidad Ikiam

Contenido

1 Antecedentes....2
2 Planteamiento del problema a investigar....3
3 Justificación de la investigación....4
4 Preguntas de investigación e hipótesis....4
5 Objetivos de la investigación....5
5.1 General....5
5.2 Específicos....5
6 Metodología....5
6.1 Área de estudio....5
6.2 Diseño de muestreo....6
6.3 Obtención y procesamiento de muestras bacterianas....7
6.4 Identificación taxonómica de aislados bacterianos....8
6.5 Análisis de composición bacteriana....8
7 Cronograma....9
8 Referencias bibliográficas....10

INVESTIGACIÓN | Parroquia Muyuna, kilómetro 7 vía a Alto Tena
INNOVACIÓN | Tena · Napo · Ecuador
EDUCACIÓN | **Telf.:** (06) 370 0040 · (06) 299 9160

1 Abstract

Este estudio comparará la composición de bacterias cutáneas cultivables asociadas a *Adenomera sp.* en ambientes urbanos y de bosque del cantón Tena, provincia de Napo, debido a la limitada información sobre la influencia del disturbio ambiental en la microbiota cutánea de anfibios amazónicos. Para ello, se realizarán muestreos mediante búsqueda visual activa nocturna y obtención de muestras cutáneas y ambientales por hisopado. Posteriormente, los aislados bacterianos serán cultivados e identificados molecularmente mediante el marcador 16S rRNA. Lo que permitirá analizar la riqueza y composición bacteriana entre ambos ambientes, con el fin de aportar información sobre ecología microbiana y diversidad bacteriana asociada a anfibios amazónicos.

***Palabras clave*:** *Adenomera sp*., microbiota cutánea; bacterias cultivables; disturbio ambiental; anfibios amazónicos; 16S rRNA.

2 Antecedentes

La piel de los anfibios constituye una de las principales superficies de interacción entre el organismo y el ambiente, ya que participa en funciones como la respiración cutánea y la regulación hídrica (Hickman et al., 2017). Debido a su alta permeabilidad y exposición constante al entorno, la piel alberga diversos microorganismos asociados al hospedero, conocidos como microbiota cutánea. Estos microorganismos forman parte de las interacciones naturales entre el organismo y su ambiente y pueden contribuir al equilibrio microbiano de la piel (Madigan et al., 2021).

Diversos estudios han demostrado que la microbiota cutánea en anfibios puede variar tanto por características propias del hospedero como por factores ambientales asociados al hábitat (Walke et al., 2014; Bates et al., 2019). Variables como la humedad, la temperatura, la cobertura vegetal y el nivel de disturbio ambiental pueden influir en la composición de las bacterias presentes en la piel. En ambientes urbanos, por ejemplo, las modificaciones del microclima y la fragmentación del hábitat pueden alterar la estabilidad del microbioma cutáneo en comparación con ambientes de bosque más conservados (Zhou et al., 2023).

Debido a su contacto constante con el suelo, la hojarasca y otros componentes del entorno inmediato, parte de las bacterias registradas en la piel puede estar relacionada con microorganismos ambientales (Walke et al., 2014). Debido a esto, distintos estudios han

INVESTIGACIÓN | Parroquia Muyuna, kilómetro 7 vía a Alto Tena
INNOVACIÓN | Tena · Napo · Ecuador
EDUCACIÓN | **Telf.:** (06) 370 0040 · (06) 299 9160

resaltado la importancia de estandarizar aspectos como el periodo climático, el horario y el esfuerzo de búsqueda durante el muestreo, ya que estas variables pueden influir tanto en la actividad de los individuos como en los microorganismos registrados (Bates et al., 2019).

El estudio de bacterias cultivables permite trabajar con microorganismos viables bajo condiciones controladas de laboratorio y facilita su posterior aislamiento e identificación taxonómica. Yánez-Galarza et al. (2024) aislaron y caracterizaron bacterias cutáneas asociadas a anfibios ecuatorianos, demostrando la utilidad de este enfoque para comparar microorganismos asociados a distintos hospedadores y ambientes. Para la caracterización molecular de bacterias cultivables se utilizan marcadores asociados al gen 16S rRNA, utilizados para la identificación taxonómica bacteriana (Johnson et al., 2019). En el laboratorio donde se desarrollará este estudio se dispone además de protocolos basados en el marcador 16S_Bac para la identificación molecular de bacterias cultivables.

A pesar de los avances recientes en estudios relacionados con microbiota cutánea en anfibios, en Ecuador todavía existe poca información sobre cómo varían las bacterias cutáneas cultivables entre ambientes urbanos y de bosque utilizando una misma especie hospedadora como referencia. Esta falta de información limita la comprensión de cómo el disturbio ambiental podría influir sobre los microorganismos asociados a anfibios amazónicos, especialmente en ecosistemas amazónicos donde este tipo de estudios aún son escasos.

El género *Adenomera* (Anura: Leptodactylidae) representa un modelo adecuado para este tipo de estudios debido a su presencia tanto en ambientes urbanos como en áreas de bosque del cantón Tena (Pasmai Martínez, 2024). Esto permite realizar comparaciones entre ambientes contrastantes reduciendo la variabilidad asociada a diferencias entre especies. En este contexto, el presente estudio busca comparar la composición de bacterias cutáneas cultivables asociadas a *Adenomera* sp. entre ambientes urbanos y de bosque en la provincia de Napo.

3 Planteamiento del problema a investigar

Aunque diversos estudios han demostrado que las condiciones ambientales pueden influir en la microbiota cutánea de los anfibios (Walke et al., 2014; Bates et al., 2019), en Ecuador todavía existe poca información sobre cómo varían las bacterias cutáneas cultivables entre ambientes urbanos y de bosque utilizando una misma especie como modelo de comparación.

INVESTIGACIÓN | Parroquia Muyuna, kilómetro 7 vía a Alto Tena
INNOVACIÓN | Tena · Napo · Ecuador
EDUCACIÓN | Telf.: (06) 370 0040 · (06) 299 9160

En el cantón Tena, *Adenomera* sp. se encuentra presente tanto en zonas urbanas como en áreas de bosque cercanas (Pasmai Martínez, 2024), lo que permite realizar comparaciones entre ambos ambientes bajo un mismo marco taxonómico. Sin embargo, hasta el momento no se ha evaluado si existen diferencias en la composición de bacterias cutáneas cultivables asociadas a esta especie entre ambientes con diferente nivel de intervención humana.

4 Justificación de la investigación

El estudio de bacterias asociadas a la piel de anfibios permite comprender cómo las condiciones ambientales pueden influir sobre los microorganismos presentes en estos organismos. En ecosistemas amazónicos, donde este tipo de investigaciones aún son escasas, el análisis de bacterias cultivables representa una alternativa útil para aislar e identificar microorganismos bajo condiciones controladas de laboratorio.

La comparación entre zonas urbanas y áreas de bosque utilizando una misma especie permite reducir la variación asociada a diferencias entre hospedadores y enfocar el análisis en posibles cambios relacionados con la intervención humana sobre el ambiente. En este contexto, *Adenomera* sp. representa un modelo adecuado debido a su presencia tanto en áreas urbanas como en zonas de bosque del cantón Tena.

Además, este estudio aportará información sobre la microbiota cutánea de anfibios amazónicos en ambientes con diferente nivel de disturbio, contribuyendo al conocimiento microbiológico de especies poco estudiadas en la Amazonía ecuatoriana.

5 Preguntas de investigación e hipótesis

¿Cómo varía la riqueza de bacterias cutáneas cultivables asociadas a Adenomera sp. entre ambientes urbanos y de bosque en la provincia de Napo?

H0: La riqueza de bacterias cutáneas cultivables asociadas a *Adenomera* sp. se mantiene similar entre ambientes urbanos y de bosque, independientemente de las diferencias ambientales presentes entre ambos ambientes.

H1: La riqueza de bacterias cutáneas cultivables asociadas a *Adenomera* sp. es mayor en ambientes de bosque que en ambientes urbanos, debido a las diferencias ambientales asociadas al disturbio antrópico y a la mayor heterogeneidad ambiental presente en áreas de bosque.

INVESTIGACIÓN | Parroquia Muyuna, kilómetro 7 vía a Alto Tena
INNOVACIÓN | Tena · Napo · Ecuador
EDUCACIÓN | Telf.: (06) 370 0040 · (06) 299 9160
www.ikiam.edu.ec
@u_ikiam IkiamOficial u_ikiam Universidad Ikiam

¿Existen diferencias en la composición de bacterias cutáneas cultivables asociadas a Adenomera sp. entre ambientes urbanos y de bosque en la provincia de Napo?

H0: La composición de bacterias cutáneas cultivables asociadas a *Adenomera* sp. se mantiene similar entre ambientes urbanos y de bosque, pese a las diferencias en el nivel de intervención humana entre ambos ambientes.

H1: La composición de bacterias cutáneas cultivables asociadas a *Adenomera* sp. difiere entre ambientes urbanos y de bosque, debido a las variaciones ambientales y al diferente nivel de intervención humana presente en cada ambiente.

6 Objetivos de la investigación

6.1 General

Comparar la composición de bacterias cutáneas cultivables asociadas a *Adenomera* sp. entre ambientes urbanos y de bosque en la provincia de Napo.

6.2 Específicos

- Aislar bacterias cutáneas cultivables asociadas a *Adenomera* sp. en ambientes urbanos y de bosque.
- Identificar taxonómicamente los aislados bacterianos mediante caracterización molecular utilizando el marcador bacteriano 16S_Bac.
- Comparar la riqueza y composición de bacterias cutáneas cultivables asociadas a *Adenomera* sp. entre ambientes urbanos y de bosque.

7 Metodología

7.1 Área de estudio

El estudio se desarrollará en el cantón Tena, provincia de Napo, Ecuador. Se seleccionarán dos tipos de ambiente con diferente nivel de disturbio: un ambiente urbano localizado dentro de la ciudad de Tena y un ambiente correspondiente a áreas de bosque cercanas a la Reserva Biológica Colonso Chalupas y a la Universidad Regional Amazónica Ikiam. De acuerdo con el Sistema de Clasificación de Ecosistemas del Ecuador Continental del Ministerio del Ambiente del

INVESTIGACIÓN | Parroquia Muyuna, kilómetro 7 vía a Alto Tena
INNOVACIÓN | Tena · Napo · Ecuador
EDUCACIÓN | Telf.: (06) 370 0040 · (06) 299 9160
www.ikiam.edu.ec
@u_ikiam IkiamOficial u_ikiam Universidad Ikiam

Ecuador (MAE, 2013), la zona de estudio forma parte de ecosistemas amazónicos húmedos característicos de tierras bajas.

Ambos sitios presentan registros de *Adenomera* sp., lo que permite realizar comparaciones entre ambientes contrastantes bajo un mismo marco taxonómico (Pasmai Martínez, 2024). Los muestreos se realizarán durante un mismo periodo climático, correspondiente a meses de menor precipitación relativa en la zona, con el fin de reducir posibles variaciones asociadas a cambios estacionales. Además, las jornadas de muestreo se estandarizarán considerando horarios y esfuerzo de búsqueda similares entre ambientes.

7.2 Diseño de muestreo

Se empleará un diseño comparativo utilizando a *Adenomera* sp. como especie modelo en ambientes urbanos y de bosque del cantón Tena. En cada ambiente se seleccionarán puntos de muestreo con registros previos de la especie, incluyendo sitios urbanos y áreas de bosque asociadas a parcelas o proyectos de investigación de la universidad.

El muestreo se realizará mediante búsqueda visual activa nocturna (Heyer et al., 1994). En cada ambiente se efectuarán tres jornadas de muestreo realizadas en noches diferentes, con un esfuerzo estandarizado de dos horas por jornada. Durante este periodo se registrarán todos los individuos adultos capturados y se tomarán muestras de microbiota cutánea y del sustrato inmediato donde se encuentre cada individuo.

Las jornadas de muestreo se desarrollarán dentro de una misma temporada climática y se evitarán noches de luna llena como criterio de estandarización. Además, durante cada salida se registrarán variables ambientales como temperatura, humedad relativa, coordenadas y tipo de sustrato. La temperatura y humedad relativa se medirán mediante un termohigrómetro digital portátil.

Se considerarán individuos adultos aquellos que presenten tamaño corporal y características morfológicas compatibles con adultos de *Adenomera* sp. Una vez finalizado el procedimiento de muestreo, los individuos serán liberados en el mismo punto de captura.

INVESTIGACIÓN | Parroquia Muyuna, kilómetro 7 vía a Alto Tena
INNOVACIÓN | Tena · Napo · Ecuador
EDUCACIÓN | Telf.: (06) 370 0040 · (06) 299 9160
www.ikiam.edu.ec
@u_ikiam IkiamOficial u_ikiam Universidad Ikiam

7.3 Obtención y procesamiento de muestras bacterianas

Las muestras de microbiota cutánea se obtendrán mediante hisopado externo utilizando hisopos estériles de un solo uso, siguiendo protocolos empleados en estudios de bacterias cutáneas cultivables en anfibios (Lauer et al., 2008; Yánez-Galarza et al., 2024). Los individuos serán capturados mediante búsqueda visual activa nocturna y las muestras serán tomadas inmediatamente después de la captura, evitando alteraciones asociadas a la manipulación prolongada fuera de su entorno.

Antes del hisopado, cada individuo será enjuagado con agua estéril para disminuir microorganismos transitorios asociados al ambiente y mantener un procedimiento uniforme entre muestras. Durante todo el proceso se evitará el contacto entre individuos y se utilizarán guantes de nitrilo estériles, los cuales serán cambiados entre cada ejemplar para evitar contaminación cruzada.

El hisopado se realizará siguiendo el mismo procedimiento para todos los individuos, utilizando el mismo tipo de hisopo y el mismo número de pasadas por región corporal. Se efectuarán seis pasadas sobre la superficie dorsal, seis sobre la superficie ventral y seis sobre las extremidades posteriores, evitando la región cloacal.

Además del hisopado cutáneo, se tomará una muestra del sustrato inmediato donde se encuentre cada individuo, ya sea suelo, hojarasca u otra superficie de contacto, utilizando el mismo tipo de hisopo y el mismo número de pasadas en todos los casos. También se incluirá un control negativo de campo mediante un hisopo estéril expuesto al ambiente durante el procedimiento, sin contacto directo con el individuo ni con el sustrato.

Cada muestra será colocada inmediatamente en tubos estériles debidamente rotulados con el código del individuo, ambiente, sitio y jornada de muestreo, manteniendo la trazabilidad durante todo el procesamiento microbiológico. Luego, las muestras serán transportadas en un cooler portátil con paquetes de gel refrigerante, evitando su exposición directa a altas temperaturas y a la luz solar. Todas las muestras se mantendrán aproximadamente a 4 °C y serán procesadas dentro de un máximo de 24 horas posteriores a su recolección para preservar la viabilidad de las bacterias cultivables (Yánez-Galarza et al., 2024).

Una vez en el laboratorio, los hisopos serán sembrados en medios de cultivo generales utilizados para bacterias heterotróficas asociadas a anfibios (Lauer et al., 2008). Las placas serán monitoreadas periódicamente y las colonias bacterianas se diferenciarán según diferencias

INVESTIGACIÓN | Parroquia Muyuna, kilómetro 7 vía a Alto Tena
INNOVACIÓN | Tena · Napo · Ecuador
EDUCACIÓN | Telf.: (06) 370 0040 · (06) 299 9160
www.ikiam.edu.ec
@u_ikiam IkiamOficial u_ikiam Universidad Ikiam

morfológicas visibles como forma, tamaño, color y borde. Posteriormente, los aislados seleccionados serán purificados mediante resiembras sucesivas hasta obtener cultivos con morfología homogénea.

7.4 Identificación taxonómica de aislados bacterianos

La identificación taxonómica de los aislados bacterianos se realizará mediante análisis molecular utilizando el marcador bacteriano 16S rRNA, empleado en estudios de caracterización bacteriana (Johnson et al., 2019). Para ello, se trabajará únicamente con aislados previamente purificados.

A partir de estos cultivos se realizará la extracción de ADN bacteriano siguiendo los protocolos disponibles en el laboratorio para bacterias cultivables. Posteriormente, se efectuará la amplificación del gen 16S rRNA mediante PCR utilizando el protocolo 16S_Bac empleado en el laboratorio para la identificación molecular de bacterias. Todas las muestras serán procesadas bajo las mismas condiciones de amplificación para mantener criterios uniformes entre aislados. Los productos obtenidos serán verificados mediante electroforesis y posteriormente enviados a secuenciación. Las secuencias obtenidas serán comparadas con bases de datos de referencia, como GenBank, mediante herramientas de comparación molecular para la asignación taxonómica de los aislados bacterianos identificados. Además, se verificará la disponibilidad de secuencias de referencia asociadas al marcador 16S rRNA para facilitar la comparación y alineación de las secuencias obtenidas.

La clasificación obtenida permitirá organizar los taxones bacterianos registrados según individuo, ambiente y sitio de muestreo. Además, cada aislado conservará un código asociado a su muestra original para mantener la trazabilidad durante el procesamiento molecular.

7.5 Análisis de composición bacteriana

La composición bacteriana se analizará según los taxones identificados en los aislados obtenidos de cada individuo muestreado. Para ello, se organizará una base de datos con los taxones bacterianos registrados, el individuo correspondiente, el ambiente y el sitio de procedencia.

INVESTIGACIÓN | Parroquia Muyuna, kilómetro 7 vía a Alto Tena
INNOVACIÓN | Tena · Napo · Ecuador
EDUCACIÓN | Telf.: (06) 370 0040 · (06) 299 9160

www.ikiam.edu.ec
@u_ikiam IkiamOficial u_ikiam Universidad Ikiam

A partir de esta información se describirá la riqueza de bacterias cultivables presente en cada ambiente, así como la frecuencia relativa de los taxones identificados. También se identificarán taxones compartidos y exclusivos entre ambientes para identificar posibles diferencias en la composición bacteriana asociadas al disturbio ambiental.

La diversidad bacteriana se analizará mediante el índice de Shannon y las diferencias entre ambientes se evaluarán mediante pruebas no paramétricas (Walke et al., 2014). Los resultados se representarán mediante tablas y gráficos de distribución y diversidad bacteriana. Todos los análisis y visualizaciones se realizarán utilizando el software R (R Core Team, 2024).

8 Cronograma

Fase	Actividades	Periodo aproximado
Ajustes y planificación	Revisión final del anteproyecto con el tutor. Ajustes metodológicos. Coordinación con el laboratorio y preparación de materiales e insumos necesarios para el muestreo y procesamiento microbiológico.	**Mayo**
Muestreo en campo	Muestreo de Adenomera sp. en ambientes urbanos y de bosque. Registro de variables ambientales, toma de muestras cutáneas y ambientales, transporte y conservación de muestras.	**Junio - Julio**
Procesamiento microbiológico	Siembra de muestras, incubación, monitoreo de crecimiento bacteriano, selección de colonias y purificación de aislados bacterianos. Organización y codificación de muestras y aislados.	**Julio – Septiembre**

INVESTIGACIÓN | Parroquia Muyuna, kilómetro 7 vía a Alto Tena
INNOVACIÓN | Tena · Napo · Ecuador
EDUCACIÓN | Telf.: (06) 370 0040 · (06) 299 9160

Identificación taxonómica	Extracción de ADN bacteriano, amplificación del gen 16S rRNA mediante PCR, verificación de productos y envío a secuenciación. Organización y revisión de secuencias obtenidas.	**Septiembre – Noviembre**
Análisis de datos y redacción	Organización de bases de datos, análisis de composición bacteriana, elaboración de tablas y gráficos, interpretación de resultados y redacción de capítulos finales.	**Noviembre – Enero (2027)**

9 Referencias bibliográficas.

Bates, K. A., Clare, F. C., O'Hanlon, S., Bosch, J., Brookes, L., Hopkins, K., McLaughlin, E. J., Daniel, O., Garner, T. W. J., & Fisher, M. C. (2019). Amphibian chytridiomycosis outbreak dynamics are linked with host skin microbiome structure. *Frontiers in Microbiology, 10*, 1951. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01951

Hickman, C. P., Roberts, L. S., Keen, S. L., Larson, A., Eisenhour, D. J., & l'Anson, H. (2017). *Integrated principles of zoology* (17th ed.). McGraw-Hill Education.

Johnson, J. S., Spakowicz, D. J., Hong, B.-Y., Petersen, L. M., Demkowicz, P., Chen, L., Leopold, S. R., Hanson, B. M., Agresta, H. O., Gerstein, M., Sodergren, E., & Weinstock, G. M. (2019). Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species-level bacterial identification. *mSystems, 4*(4), e00029-19. https://doi.org/10.1128/mSystems.00029-19

Lauer, A., Simon, M. A., Banning, J. L., Lam, B. A., & Harris, R. N. (2008). Diversity of cutaneous bacteria with antifungal activity isolated from amphibians. *Applied and Environmental Microbiology, 74*(23), 7050–7057. https://doi.org/10.1128/AEM.01209-08

Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M., & Stahl, D. A. (2021). *Brock biology of microorganisms* (16th ed.). Pearson.

Walke, J. B., Becker, M. H., Loftus, S. C., House, L. L., Cormier, G., Jensen, R. V., & Belden, L. K. (2014). Amphibian skin may select for rare environmental microbes. *The ISME Journal, 8*(11), 2207–2217. https://doi.org/10.1038/ismej.2013.217

INVESTIGACIÓN | Parroquia Muyuna, kilómetro 7 vía a Alto Tena
INNOVACIÓN | Tena · Napo · Ecuador
EDUCACIÓN | Telf.: (06) 370 0040 · (06) 299 9160

www.ikiam.edu.ec
@u_ikiam IkiamOficial u_ikiam Universidad Ikiam

Yánez-Galarza, A., Ortega, M., Arias, A., & Muñoz, Y. (2024). Cultivable skin bacteria of Ecuadorian amphibians along environmental gradients. *PeerJ, 12*, e18317. https://doi.org/10.7717/peerj.18317

Zhou, X., Liu, Y., Zhang, Y., Li, J., & Wang, Y. (2023). Urbanization alters stochasticity and stability of amphibian skin microbiomes. *Science of the Total Environment, 872*, 161214. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.161214

Pasmai Martínez, E. D. (2024). *Ecología espacial de Adenomera sp. en el cantón Tena* [Tesis de pregrado, Universidad Regional Amazónica Ikiam].

INVESTIGACIÓN | Parroquia Muyuna, kilómetro 7 vía a Alto Tena
INNOVACIÓN | Tena · Napo · Ecuador
EDUCACIÓN | **Telf.:** (06) 370 0040 · (06) 299 9160

www.ikiam.edu.ec
@u_ikiam IkiamOficial u_ikiam Universidad Ikiam