

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

ESCUELA DE BIOANÁLISIS

**DISERTACIÓN PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO
DE MICROBIÓLOGA**

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICÓTICO DE
BACTERIAS AISLADAS DE LA PIEL DE SAPOS
HYLOXALUS DELATORREAE, *HYLOSCIRTUS*
LARINOPYGION, *PRISTIMANTIS PYRRHOMERUS* Y
PRISTIMANTIS SP. DE LA LOCALIDAD DE MORÁN
(PROVINCIA DEL CARCHI) FRENTE AL HONGO
PATÓGENO *BATRACHOCHYTRIUM DENDROBATIDIS*.”**

MILENA JAZMÍN GARZÓN LARREA

**DIRECTOR:
MSC. PABLO PALACIOS BONIFAZ**

QUITO, 2014

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, MILENA JAZMÍN GARZÓN LARREA, C.I. 171616698-6; autora del trabajo de graduación intitulado: “Evaluación del efecto antimicótico de bacterias aisladas de la piel de sapos *Hyloxalus delatorreae*, *Hyloscirtus larinopygion*, *Pristimantis pyrrhomerus* y *Pristimantis sp.* de la localidad de Morán (provincia del Carchi) frente al hongo patógeno *Batrachochytrium dendrobatidis*.”, previa a la obtención del grado académico de MICROBIÓLOGA en la Escuela de Bioanálisis:

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través de sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.



MILENA JAZMÍN GARZÓN LARREA

C.I. 171616698-6

Quito, 2014

DEDICATORIA

A Dios.

A mí.

A mi mami y mi hermana.

Al amor de mi vida.

Gracias a Dios porque sin él nada sería posible, por darme la vida y permitirme aprovechar cada una de las oportunidades que me ha brindado.

A mí misma porque todo lo que hago es para mi propio desarrollo y mi crecimiento personal y esta una meta de las muchas que voy a cumplir.

A mi mami y mi hermana por estar a mi lado y acompañarme durante estos años y apoyarme en cada una de mis decisiones las amo con todo mi corazón.

Al amor de mi vida, David porque me has demostrado que con amor, constancia y una mente positiva todo es posible y este es el inicio de muchos planes y sueños que vamos a cumplir juntos te amo.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar a Dios por permitirme abrir mis ojos cada día y darme todo para seguir adelante, a mi madre que con su fuerza y amor me impulsó a no dejar este gran sueño y confió en mí en todo momento.

Gracias a mi director de la disertación Pablito Palacios por siempre tener la disposición de ayudarme desde el inicio de este reto, a Miryan Rivera por abrirme las puertas del CICBA para poder desarrollar mi proyecto, a Ailin Blasco por su colaboración con la información proporcionada durante el proceso y su amistad a lo largo del mismo y cada uno de los integrantes del laboratorio que me brindaron su apoyo. El MSc Pablo Menéndez por contribuir los datos de la identificación molecular en este estudio.

A la PUCE y a cada uno de mis docentes que me acompañaron en este proceso, a mis amigos y compañeros por compartir experiencias muy lindas y estar en las buenas y en las malas. No puedo dejar de agradecer a mis abuelitos que con su amor infinito y preocupación siempre buscaron mi bienestar, creyeron en mí y nunca me dejaron sola. A mi novio quien día a día contribuye en mi crecimiento y con su paciencia siempre me acompañó y apoyó en todo momento.

Con cariño

Milena

INDICE DE CONTENIDOS

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN	ii
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
INDICE DE CONTENIDOS.....	v
INDICE DE FIGURAS	viii
INDICE DE TABLAS.....	ix
INDICE DE ANEXOS	x
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT	xii
CAPÍTULO I.....	1
INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Objetivos.....	5
1.1.1 Objetivo General.....	5
1.1.2 Objetivos Específicos	5
CAPÍTULO II.....	6
Antecedentes.....	6
2.1 Anuros.....	7
2.1.1 <i>Hyloxalus delatorreae</i>	7
2.1.2 <i>Pristimantis pyrrhomerus</i>	8
2.1.3 <i>Hyloscirtus larinopygion</i>	8
2.2 Hongo Patógeno.....	9
2.2.1 <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	9
2.2.2 Ciclo de vida de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	11
2.3 Enfermedad	14
2.3.1 Patogénesis	14

2.3.2	Respuesta de los anfibios a la quitridiomycosis	15
2.4	Efecto antimicótico	17
2.4.1	Importancia en la identificación de bacterias con efecto <i>anti-Bd</i>	17
CAPÍTULO III		20
Marco Metodológico		20
3.1	Tipo de Estudio	20
3.2	Población	20
3.3	Criterios de inclusión	20
3.4	Limitaciones del estudio	20
3.5	Diseño del Experimento.....	21
3.6	Equipos y materiales	22
3.6.1	Equipos	22
3.6.2	Materiales	22
3.7	Técnica.....	23
3.7.1	Protocolo para aislamiento bacteriano de la piel de anuros y pruebas de antagonismo frente a <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	23
3.7.1.1	Lavado de Individuos:	23
3.7.1.2	Diluciones y siembra en medios de cultivo R2A:.....	24
3.7.1.3	Preservación de cepas bacterianas (Flechas, 2012)	28
3.7.1.4	Pruebas de antagonismo.....	29
3.7.1.5	Medición de halos de inhibición	32
3.7.1.6	Identificación molecular de bacterias <i>anti-Bd</i>	32
3.8	Control de calidad	32
3.9	Análisis estadístico	33
CAPÍTULO IV		34
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		34
4.1	Resultados	34

4.1.1	Resultados de total de morfotipos bacterianos aislados	34
4.1.2	Resultados de la evaluación <i>in vitro</i> del efecto antimicótico de las bacterias aisladas	35
4.1.3	Resultados de la Prueba de Normalidad, ANOVA y ANCOVA.	35
4.1.4	Resultados de la tinción de Gram.....	38
4.1.5	Resultados de la identificación molecular.....	40
4.2	DISCUSIÓN.....	43
	CONCLUSIONES.....	45
	RECOMENDACIONES	46
	BIBLIOGRAFIA	47
	ANEXOS.....	54

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> adaptado. Rosenblum et al., 2010	13
Figura 2. Zonas de muestreo en los anuros para la obtención de bacterias encontradas en piel. Flechas, (2012).....	23
Figura 3. Esquema de diluciones en DS y siembra en R2A. Flechas, (2012).....	25
Figura 4. Distintos morfotipos aislados de la dilución 10^5 en medio R2A.	26
Figura 5. Aislamiento de morfotipos bacterianos en cuadrícula en Agar Nutritivo.....	27
Figura 6. Morfotipos aislados y purificados en Agar Nutritivo.	27
Figura 7. Criopreservación de morfotipos.....	28
Figura 12. Tinción Gram del morfotipo PB4-2 en 100X.	30
Figura 9: Morfotipo PB4-2 repetición 2, día 3.....	31
Figura 8: Morfotipo PB4-2 repetición 1, día 3.....	31
Figura 11: Morfotipo PB4-2 repetición 2, día 5.....	31
Figura 10: Morfotipo PB4-2 repetición 1, día 5.....	31
Figura 13. Total de morfotipos bacterianos aislados.....	34
Figura 14. Total de morfotipos bacterianos con inhibición.....	35
Figura 15. Diagrama de cajas de la media de los pixeles en la escala de grises de las especies de anuros	38
Figura 16. Resultado de tinción Gram de morfotipos inhibitorios.....	39
Figura 17. Resultado de tinción Gram por especie de Anuro.....	40

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Anuros muestreados por el equipo del CICBA.	24
Tabla 2. Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra	36
Tabla 3. ANOVA de valores de la media de los pixeles en la escala de grises obtenida de la medición del Image J.	36
Tabla 4. ANCOVA	37
Tabla 5. Identificación molecular de morfotipos bacterianos inhibitorios. Menéndez, 2013.	41

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Fórmula de solución DS y medio de cultivo R2A.....	55
Anexo 2. Descripción Colonial del libro “Microbes in Action: A Laboratory Manual of Microbiology”, Seeley y Vandemark, 1981	56
Anexo 3. Descripción de características morfológicas de los morfotipos bacterianos aislados.	57
Anexo 4. Descripción microscópica de los morfotipos con inhibición.....	62
Anexo 5. Protocolo para medir el halo de inhibición <i>Bd</i> sugerido por la Lcda. Ailin Blasco.	64
Anexo 6. Protocolo de extracción de ADN bacteriano por el método de calentamiento, Kim et al. (2012) con modificaciones establecidas para el CICBA.	66
Anexo 7. Concentración de ADN enviado a Macrogen Inc. (Seúl-Corea).	67

RESUMEN

En el Ecuador casi una de cada tres especies de anfibios está amenazada con extinción, esto corresponde a 148 especies equivalente a 31,3%. Los declines de anfibios neotropicales se sugieren por efectos sinérgicos entre varios factores al cambio climático, pérdida de hábitat y quitridiomycosis. La quitridiomycosis es una enfermedad infecciosa asociada a los declines de anfibios a nivel mundial que es causada por el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis*. El patógeno afecta directamente la piel del anuro la cual regula el funcionamiento del intercambio de gases respiratorios y agua, provocando un desequilibrio osmótico y la reducción en las concentraciones de electrolitos plasmáticos que llevan al deterioro del funcionamiento eléctrico y la muerte. Por otro lado se conoce que las bacterias presentes como simbiontes en la piel son las que ayudan a la persistencia de algunas poblaciones de anfibios frente a esta infección.

El presente estudio es descriptivo y tiene como objetivo evaluar el efecto antimicótico de las bacterias aisladas de la piel de anuros frente al hongo patógeno. Para cumplir con este objetivo se analizaron 12 anuros de cuatro especies distintas de las cuales se aislaron bacterias de la piel que fueron probadas en los respectivos ensayos de antagonismo para su posterior identificación molecular.

En este estudio se logró aislar un total de 147 morfotipos bacterianos de la piel de cuatro especies de anuros de los cuales 67 morfotipos presentan inhibición, además el mayor número de morfotipos bacterianos con inhibición que se identificaron pertenecen al género *Pseudomonas* de las especies de anfibios analizados, *Pristimantis pyrrhomerus* una especie amenazada que tiene la mayor inhibición frente al patógeno. Concluyendo que existen bacterias en la piel de los anfibios analizados que inhiben *in vitro* el crecimiento de *Batrachochytrium dendrobatidis*.

ABSTRACT

In Ecuador nearly one of three amphibian species are threatened with extinction, this corresponds to 31.3% equivalent to 148 species, the decline of Neotropical amphibians are suggested by synergistic effects of several factors: climate change, habitat loss and chytridiomycosis. Chytridiomycosis is an infectious disease associated with declines of amphibians worldwide that is caused by the fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*, the pathogen directly affects the anuran's skin which regulates the functioning of the respiratory gas exchange and water, causing an osmotic imbalance and reduction in serum electrolyte concentrations leading to a deterioration of the electrical performance and death. Moreover it is known that symbionts bacteria in the skin are what help to the persistence of some amphibian populations against this infection.

This study is descriptive and aims to assess antifungal effect of the bacteria isolated from the skin of frogs against the pathogenic fungus. To obtain this objective 12 anuran of four different species were collected. The skin bacteria were tested in the respective assays of antagonism for subsequent molecular identification.

In this study it was possible to isolate a total of 147 morphotypes skin four anuran species of which 67 bacterial morphotypes show inhibition. Further the highest number of bacterial morphotypes with inhibition belong to the genus identified *Psuedomonas*. *Pristimantis pyrrhomerus* was one of anuran species analyzed, which is threatened and it has the highest inhibition against the pathogen. Concluding that in the skin of amphibians analyzed are bacteria that inhibit *in vitro* growth of *Batrachochytrium dendrobatidis*.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

La población de anfibios en el Ecuador se encuentra declinando porque casi una de cada tres especies de anfibios ecuatorianos está amenazada con extinción, esto corresponde a 148 especies equivalente a 31.3% y podría llegar a ser considerada hasta el 44%, si se excluyen las 136 especies de la categoría Datos Deficientes (especies sin información suficiente para definir su categoría de riesgo). Por lo tanto, el 60% de anfibios del Ecuador o están amenazados o bien son tan poco conocidos que su estado de conservación no puede ser determinado de acuerdo a la categoría de estados de conservación de la Lista Roja (Ron, Guayasamin, Yanez-Muñoz, Merino-Viteri y Ortiz, 2014). Se ha sugerido efectos sinérgicos entre varios factores que estarían involucrados en las declinaciones de anfibios neotropicales: cambio climático, pérdida de hábitat y quitridiomycosis. Varias investigaciones en el Ecuador han corroborado estos resultados (Lips, 1998; Ron, Duellman, Coloma y Bustamante, 2003; Menéndez y Graham, 2013; y Ron et al., 2014) por esta razón, es prioritario continuar con investigaciones que permitirán conocer las variables que están ocasionando esta situación a nivel mundial.

La quitridiomycosis, causada por hongo *Batrachochytrium dendrobatidis*, es una enfermedad que ha sido asociada al fenómeno de declinaciones poblacionales y extinciones de especies de anfibios alrededor del mundo (Lips, Diffendorfer, Mendelson y Sears, 2008). Sin embargo, existen ciertas interacciones entre huésped, microbios y el patógeno que pueden mediar destrezas para contrarrestar la quitridiomycosis (Harris, Brucker, Walke, Becker, Schwantes, Flaherty, et al., 2009a) y es así que la misma comunidad microbiana de los anfibios actúa como controlador biológico en la acción de los efectos adversos del hongo *B. dendrobatidis* (Ezziyyani, Ahmed, Pérez, Requena y Candela, 2006). Por esta razón varios estudios se han enfocado en el análisis de las bacterias con capacidad antifúngica presentes en la piel de los anfibios (Harris et al., 2009a; Harris, Lauer, Simon, Banning y Alford, 2009b; Becker, Brucker, Schwantes, Harris y Minbiole, 2009; Brecker et al., 2012). Las pruebas de susceptibilidad antifúngica *in vitro* y el desarrollo de protocolos de tratamiento eficaces y seguros

constituyen medidas para mediar la enfermedad que afecta a los anfibios tanto en cautiverio como en la naturaleza (Martel et al., 2010).

Experimentos aleatorios confirman que si se aumentan bacterias con capacidad antifúngica a *B. dendrobatidis* (bacterias *anti Bd*), como la cepa *Janthinobacterium lividum* normalmente encontrada en la piel de ciertos anfibios y que forma parte del sistema de defensa de la salamandra *Plethodon cinereus*, se contrarresta el efecto del hongo mediante la producción del metabolito antifúngico violaceína (Harris et al., 2009b; Becker et al., 2009). Se conoce que existe este metabolito en la piel de individuos no colonizados por *J. lividum*; esto sugiere que no sólo un género bacteriano produce los metabolitos que inhiben al patógeno (Brucker, Baylor, Walters, Lauer, Harris y Minibiole, 2008b).

No obstante, un estudio realizado en Panamá en el anuro *Atelopus zeteki* demuestra que *Janthinobacterium lividum* colonizó únicamente de manera temporal y cuando la población bacteriana declinó, aumentaron las zoosporas *B. dendrobatidis* y no previno o se retrasó la mortalidad causada por el patógeno, enfocando así a futuras investigaciones a aislamientos bacterianos de la zona (Brecker, Harris, Minibole, Schwantes, Rollins-Smith, Reinert et al., 2012).

Además, un estudio realizado recientemente en los Estados Unidos demostró que existen poblaciones simpátricas de anfibios en decline, que poseen un número de bacterias *anti-Bd* similar a las poblaciones que persisten sin aparente efecto nocivo del hongo patógeno, lo cual sugiere que dicha resistencia o coexistencia con el patógeno está relacionada con el sistema inmunológico de los anuros y que la enfermedad parece no actuar de igual manera en todos los anfibios (Tobler y Schmidt, 2010). La respuesta inmune de los anfibios tanto la innata y adaptativa está constituida por péptidos antimicrobianos y bacterias simbiotas que poseen inhibición de crecimiento al hongo *in vitro*, lo cual demostró que la inoculación previa a la exposición del *Bd* sumada a la bioaumentación de las bacterias antimicóticas contribuyó al control de la morbilidad y mortalidad de esta enfermedad (Lam, Walke, Vredenburg y Harris, 2010).

El Ecuador posee distintas zonas climáticas y una alta biodiversidad por lo que se convierte en un lugar favorable para los estudios en anfibios (Ron et al., 2014). Sin embargo, no existen estudios sobre bacterias *anti-Bd* y debido al impacto negativo que

tiene el Bd sobre la biodiversidad es esencial realizar estudios que involucren el aislamiento de bacterias de la piel de especies de anfibios endémicos ecuatorianos con el fin de identificar las cepas bacterianas y comprender de mejor manera su comportamiento antimicótico con el hongo *Bd*.

El agente causal de la quitridiomycosis es el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis*, un microorganismo parásito inusual debido a que es el único quitridio que ataca a un animal vertebrado, en este caso a los anfibios (Longcore, Pessier y Nichols, 1999). Este hongo ha causado la declinación de poblaciones de anfibios, y en algunas ocasiones incluso extinciones masivas de especies alrededor del mundo (Voyles et al., 2009).

A nivel mundial este hongo se ha detectado en varias poblaciones de anuros, como por ejemplo en España donde el “sapo partero” especie que se encuentra en peligro de extinción, ocupa menos de 20 Km² de extensión geográfica y de sus 34 poblaciones se estima que solo quedan 2000 parejas reproductoras (Organización de los Estados Iberoamericanos, s.f). En el año 2002, Argentina registró el primer caso de quitridiomycosis en un ejemplar de *Leptodactylus latrans* de la Región Pampeana y actualmente se registran 6 especies afectadas (Ghirardi, López, Levy, Corbalán, Steciow y Perotti, 2011).

En el país se han reportado especies positivas para quitridiomycosis en *Atelopus bomolochos*, *Atelopus sp.* (Provincia del Carchi), *Gastrotheca pseustes*, *Hyla psarolaima*, *Telmatobius niger* (Ron et al., 2003), y en el caso de *Leptodactylus pentadactylus* se encuentra en tierras bajas (< 1000 m.s.n.m. McCracken, Gaertner, Forstner y Hahn, 2009). Esto sugiere que el patógeno se adapta al ambiente y las poblaciones en tierras bajas no afectadas nos pueden ayudar a comprender de mejor manera las condiciones climáticas de la enfermedad en el Ecuador (Menéndez y Graham, 2013).

Consecuentemente, esta enfermedad tendría un impacto biológico a nivel mundial, por lo que investigaciones en búsqueda de alternativas para la preservación de los anfibios son prioritarias.

Por lo tanto, el presente trabajo pretende comprobar si la inhibición del hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* varía en función de la especie bacteriana con la cual interactúa.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo General

Determinar el efecto antimicótico de bacterias aisladas de la piel de sapos *Hyloxalus delatorreae*, *Hyloscirtus larinopygion*, *Pristimantis pyrrhomerus* y *Pristimantis sp.* frente al hongo patógeno *Batrachochytrium dendrobatidis*.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Aislar y purificar las bacterias presentes en la piel de los sapos.
- Evaluar *in vitro* el efecto antimicótico de las bacterias aisladas.
- Caracterizar microscópicamente las bacterias aisladas que presentan inhibición.
- Identificar molecularmente las bacterias con capacidad antimicótica contra el hongo patógeno.

CAPÍTULO II

Antecedentes

El origen de *Batrachochytrium dendrobatidis*, el agente causal de la quitridiomycosis, es desconocido (Voyles et al., 2011), aún existe un debate acerca si el hongo aparece recientemente en las zonas de declines de anfibios o si ha sido un patógeno a largo plazo que con condiciones óptimas como la susceptibilidad del huésped o aumento en su virulencia, cambios ambientales o su combinación dan como resultado la disminución de las poblaciones (Martel et al., 2010).

Históricamente, el patógeno ha sido encontrado en la piel de sapos muertos en Australia, Norteamérica y Centroamérica. Actualmente, la declinación de anfibios asociada a *B. dendrobatidis* continúa siendo reportada incluyendo el continente Asiático y se conoce que el patógeno ha infectado a más de 350 especies de anfibios en todos los continentes excepto la Antártica (Fisher, Garner y Walker, 2009). Este hongo ha sido asociado a la declinación de poblaciones de anfibios y en algunas ocasiones incluso extinciones masivas de especies alrededor del mundo (Voyles et al., 2009). La evaluación global de los anfibios indica que con un 32.5% de sus especies amenazadas constituye la clase de vertebrados más amenazada y el 92.5% se encuentra críticamente amenazada de manera enigmática, la cual relaciona a *B. dendrobatidis* (Kilpatrick, Briggs y Daszak, 2009).

En “sapos parteros” tanto en España como Suiza han sufrido declines donde más del 50% de las poblaciones se extinguieron durante el último cuarto de siglo y se sigue extendiendo la enfermedad a lo largo del país (Rosenblum, Voyles, Poorten y Stajich, 2010). Las infecciones de quitridiomycosis se han reportado en anfibios como el sapo australiano *Rheobatrachus sp.*, el sapo panameño dorado *Atelopus zeteki* y el sapo de hocico afilado *Taudactylus acutirostris* (Fisher et al., 2009)

La enfermedad ha impactado mayormente en los Neotrópicos donde los declines de anuros se reportan desde la década de 1980 tanto en Costa Rica, Venezuela y Ecuador. En Sudamérica se reportan actualmente casos de quitridiomycosis en Ecuador, Perú, Venezuela, Uruguay, Argentina y Brasil donde las pérdidas más significantes se presentaron en zonas altas (superior a 1000 m.s.n.m) (Bosch et al., 2001; Bradley et al.,

2002; Ron y Merino 2000). En Latinoamérica se asocia a *Bd* a 30 extinciones posibles de 113 *Atelopus* (sapos arlequín) (Kilpatrick et al., 2009).

En el Ecuador se ha implicado al hongo *B. dendrobatidis* y al cambio climático en la desaparición del sapo Jambato (*Atelopus ignescens*), una especie endémica de los Andes Ecuatorianos, que solía ser muy abundante en la Sierra Central del país. Así, la disminución de las precipitaciones anuales ha provocado la sequía en zonas andinas, poniendo a los anfibios al límite de su tolerancia térmica, provocando el estrés en los sapos y el desequilibrio de su sistema inmunológico; haciéndolos susceptibles a infecciones como la quitridiomycosis, dando como resultado la persistencia del patógeno y por ende la declinación de los anfibios (Menéndez y Graham, 2013; Becker y Zamudio, 2011).

Esta enfermedad se presenta con mayor frecuencia en los Neotrópicos y su negativo impacto en la biodiversidad ha dado paso a investigaciones como el aislamiento de bacterias de la piel de anfibios. Precisamente de diferentes salamandras a partir de un hisopado obtuvieron cientos de bacterias, aproximadamente 8 distintos géneros microbianos en común; de los cuales géneros como *Arthrobacter*, *Pedobacter* y *Pseudomonas* y sus distintas especies proporcionan resultados exitosos en la inhibición de este hongo a través de ensayos *in vitro* (Harris, James, Lauer, Simon y Patel, 2006).

Las bacterias presentes como simbiosis en la piel son las que ayudan a la persistencia de algunas poblaciones de anfibios. A una población de *Rana muscosa* previamente expuesta a *B. dendrobatidis* se le añadió la bacteria de piel *Janthinobacterium lividum* demostrando la protección frente a la enfermedad (Lam et al., 2010), sin embargo un factor a considerarse para el desarrollo de esta enfermedad es la susceptibilidad inmunológica de la población anfibia y las condiciones ambientales donde se encuentra. (Brucker et al., 2008a; Fisher et al., 2009).

2.1 Anuros

2.1.1 *Hyloxalus delatorreae*

De un total de 32 especies catalogadas en peligro crítico de extinción, el 15% corresponden a ranas nodrizas (Yáñez, Meza, Altamirano y Castro, 2010). Normalmente las especies de *Hyloxalus* comprenden un rango geográfico promedio de 3568,9 Km²,

sin embargo, *Hyloxalus delatorreae* la cual se encuentra En Peligro Crítico (Critical Risk, CR), ocupa el menor rango geográfico promedio de 184 Km², la misma que encuentra en los Andes del Ecuador en la zona noroccidental en alturas comprendidas entre 2340-2500 m.s.n.m. en la provincia del Carchi. En esta área existen datos de ocurrencia de la quitridiomycosis, la cual puede ser responsable del nivel actual de amenaza de la especie. En efecto, para el año 2006 se estimó la presencia de únicamente 25 individuos en un área de 9,9 hectáreas (Coloma, 2010).

Su morfología se caracteriza porque sus dedos de las extremidades inferiores no poseen membrana, es evidente la banda oblicuolateral que se extiende desde el ojo a la región inguinal y la presencia de línea ventrolateral. Su dorso es de color gris oscuro o castaño pálido con una banda lateral oblicua crema-dorada (Yáñez et al., 2010).

Registran actividad entre las 6:00 horas y 18:00 horas mayormente a las 9:00 horas hasta las 13:00 horas, en áreas con presencia de ganado donde haya alguna presencia de bosque, en canales cercanos a senderos, bajo troncos y piedras (Coloma, Ortiz y Frenkel, 2013)

2.1.2 *Pristimantis pyrrhomerus*

Pristimantis pyrrhomerus es una especie En Peligro (Endangered, EN) que se encuentra en los bosques nublados de las provincias de Pichincha, Imbabura, Carchi, Cotopaxi y Bolívar, entre los 2075 y 3000 m.s.n.m. En términos de microhábitat, prefiere ubicarse bajo piedras, troncos, y entre madera y pastos durante el día y su nivel actual de amenaza está relacionado a la introducción de actividades madereras y ganaderas, además de la quitridiomycosis (Coloma, 2004).

Su morfología se diferencia de otros *Pristimantis* por su coloración ventral blanca y sus manchas cafés (Hernández, 2012).

2.1.3 *Hyloscirtus larinopygion*

Hyloscirtus larinopygion es una especie de rana arbórea con un estado de conservación Casi Amenazada (Near, Threatened, NT) debido a la deforestación,

actividades agrícolas y contaminación en su hábitat sumada la posible relación con el cambio climático y enfermedades como la quitridiomycosis. La distribución de esta especie se ubica en los Andes de Colombia y Ecuador, en el nudo de Pasto y en la zona norte en las provincias de Carchi e Imbabura respectivamente, se la encuentra en un rango de altitud entre los 1950 y 3100 m.s.n.m. en ramas con cercanía a riachuelos (Ortiz, Coloma, Frenkel, Ron y Quiguango-Ubillús, 2013).

Fenotípicamente *Hyloscirtus larinopygion* como lo define Duellman y Hillis, 1990; presenta las siguientes características que le hacen único: (1) ausencia de bandas diagonales en los flancos; (2) en vida, dorso café canela con puntos amarillo oscuro (amarillo trogón), a nivel de las extremidades anteriores esta combinación de colores se vuelve más tenue y el color café cambia a gris-oliva; (3) color ventral gris claro; (4) iris dorado con finas reticulaciones; (5) pupila horizontal negra; (6) anillo timpánico no distinguible; (7) notable pliegue supratimpánico; (8) 3/4 dientes vomerinos; (9) brazos hipertrofiados; (10) dedos de la mano y pie con rebordes cutáneos; (11) espina prepólica curvada y puntiaguda; (12) tubérculos palmares redondeados; (13) tubérculos subarticulares redondeados; (14) tubérculo metatarsal interno pequeño y ovalado; (15) fino pliegue metatarsal; (16) tubérculo tarsal ausente; (17) en preservante el cuerpo es gris oscuro con puntos crema y el vientre oliva (Almendariz et al., 2014).

2.2 Hongo Patógeno

2.2.1 *Batrachochytrium dendrobatidis*

Batrachochytrium dendrobatidis es un hongo perteneciente a la División Chytridiomycota, ubicado como único miembro en el Orden *Rhizophydiales* por sus características fenotípicas y genómicas. Se han descrito muchas especies de quitridios en la naturaleza tanto en ambientes acuáticos y terrestres como organismos de vida libre, comensales o parásitos de invertebrados, plantas, algas, y hongos (Fisher et al., 2009). De estos quitridios *B. dendrobatidis* es un parásito inusual, debido a que es el único quitridio que ataca a un animal vertebrado, en este caso a los anfibios (Longcore, 1999).

La distribución geográfica de la enfermedad sigue en aumento, sin embargo el origen de la quitridiomycosis no tiene una evidencia clara. Existen dos hipótesis acerca

de cómo empezó esta infección: la primera indica que la enfermedad evolucionó en África, la cual se transportó intercontinentalmente mediante la difusión de las ranas *Xenopus* para acuarios, investigación científica y ensayos de fecundación en humanos de 1930 a 1960 (Rosenblum et al., 2010; James et al., 2009). La segunda propone una propagación intencional o no por medio de la *Rana catesbeiana* nativa del este de Norteamérica, por una amplia introducción a Asia, Europa, el oeste de América del Norte y América del Sur pero no se puede explicar completamente la llegada de *B. dendrobatidis* a Australia o Sudáfrica (James et al., 2009).

Se concluye que la propagación antropogénica es una explicación para algunas introducciones porque algunas especies de anfibios son comercializados a nivel mundial y actúan como reservorios de la enfermedad, sin embargo hay muchos enigmas de como llego a lugares remotos donde la introducción humana es poco probable (Rosenblum et al., 2010).

Por lo tanto, tampoco se descarta la dispersión por los mismo anuros, aguas subterráneas, aves, insectos y otros animales en movimiento, viento y otros medios podrían ser probables debido a que *Bd* tiene una fase de resistencia a condiciones medio ambientales (Kilpatrick et al., 2009).

Para poder identificar el verdadero origen del patógeno se colectan varios aislamientos de *B. dendrobatidis* los cuales son sometidos a análisis genéticos. Los patrones genéticos constatan una extremadamente baja diversidad alélica en el patógeno, sugiriendo un severo cuello de botella durante la epidemia actual. Aunque el patógeno se reproduce de manera asexual su diversidad genotípica es alta. Se usó información del lugar genómico del locus marcado para demostrar cómo esta paradoja puede ser reconsiderada señalando la perdida de heterocigocidad como producto de la recombinación mitótica (James et al., 2009).

En la revisión realizada por Fisher y colaboradores 2009 menciona que de 17 locus secuenciados de distintos *B. dendrobatidis* muestra que la diversidad de secuencias del hongo es baja con no más de 2 alelos por locus. Actualmente no se sabe si *Bd* tiene los genes para el apareamiento y la mitosis; el estudio genómico de las poblaciones ha demostrado heterocigocidad pero estos niveles no se distribuyen de manera uniforme en el genoma pero disminuyen significativamente en el cromosoma

más grande inferido donde hay la pérdida de heterocigosidad. Adicionalmente, un estudio demuestra que distintas poblaciones de un mismo lugar a pesar que la diversidad alélica es baja en todos los aislados (100), dentro de algunas poblaciones locales la diversidad es alta. En las poblaciones de alta diversidad no hay nuevos alelos y no hay genotipos compartidos entre las diferentes poblaciones infectadas, sugiriendo que la recombinación local había ocurrido dentro de los linajes introducidos que infectan lagos particulares (Fisher et al., 2009).

Estos hallazgos tienen dos interpretaciones: (1) *B. dendrobatidis* tiene el potencial de autocruzamiento que es en gran parte no realizada debido a los cuellos de botella de población, causando la pérdida de tipos de apareamiento complementarios, (2) la pérdida de heterocigosidad se puede producir a tasas variables en diferentes poblaciones, generando una falsa señal de recombinación sexual. En la actualidad, no hay datos adecuados para probar o refutar hipótesis, ya sea de manera concluyente (Fisher et al., 2009).

En general los análisis moleculares soportan la hipótesis de que es un patógeno nuevo, diploide con baja diversidad de secuencias y altamente heterocigoto lo cual sugiere que este linaje globalizado es el producto de una cruce de cepas parentales heterotáticas no idénticas pero estrechamente relacionadas (Fisher et al., 2009).

2.2.2 Ciclo de vida de *Batrachochytrium dendrobatidis*

Batrachochytrium dendrobatidis es un microorganismo oportunista de vida acuática, con distintos estados en su ciclo de vida, en su fase mótil se lo llama zoospora, la cual utiliza un flagelo para colonizar la piel de los anfibios, tendiendo como preferencia los queratinocitos de la misma (Carey et al., 2006). La zoospora se enquista, absorbe el flagelo y desarrolla rizoides. El talo maduro se desarrolla en zoosporangio (contiene zoosporas), donde el citoplasma escinde y forma zoosporas flageladas. Se forma un tubo de descargue y las zoosporas son liberadas en un ambiente externo donde pueden nadar por 24 horas para continuar su ciclo de vida (Kilpatrick et al., 2009; Voyles et al., 2011) (Ver Figura 1). El rango de pH para el crecimiento del

hongo es de 4-8 con un pH óptimo de 6-8 y una temperatura adecuada de cultivo es entre 4-25°C con su temperatura óptima en 17-25°C (Kilpatrick et al., 2009).

Hasta la fecha el entendimiento de la utilización de nutrientes por *Batrachochytrium dendrobatidis* es incompleta, no se sabe cómo *B. dendrobatidis* puede persistir en el ambiente como saprófito, utilizando materiales orgánicos no anfibios, este cuestionamiento tiene fuertes implicaciones para la evolución de la virulencia del patógeno y la epidemiología de la quitridiomycosis (Voyles et al., 2011).

El patógeno ha sido encontrado en la epidermis queratinizada de la piel de los sapos y en partes bucales de los renacuajos debido a que invade y crece inicialmente en las células epidérmicas más profundas que tienen prequeratina, y completa su desarrollo en las células totalmente queratinizadas (Voyles et al., 2011), no obstante es una idea errónea que *B. dendrobatidis* solo usa queratina como fuente de nutriente.

Igualmente *in vitro* no crecen bien en queratina pura de origen no anfibio sino en un medio de cultivo que contenga distintas concentraciones de leche peptonizada, triptona, hidrolizado gelatina, lactosa, glucosa, asparagina, extracto de levadura, extracto de malta, peptona, sucrosa, maltosa, sorbitol, y glicerol; se le adicionaron como substratos extras piel de culebra esterilizada, harina de plumas molida y piel mudada de anfibios. Consecuentemente, las tasas de crecimiento y el desarrollo del patógeno varían fuertemente en las diferentes condiciones de nutrientes; incluso en medios de cultivo estandarizados, las tasas de crecimiento pueden ser inconsistentes (Voyles et al., 2011).

Por otro lado, pese al alto nivel de similitud de los aislados de *B. dendrobatidis*, muchos estudios muestran variación en la virulencia, por lo que se requieren investigaciones donde la infección sea en condiciones controladas con acogida recíproca. Además los tratamientos y los estudios de genómica y proteómica emparejadas son necesarios para identificar los determinantes funcionales de virulencia de *Bd* que estaría posiblemente relacionada con las condiciones ambientales locales (Fisher et al., 2009; Rosenblum et al., 2010).

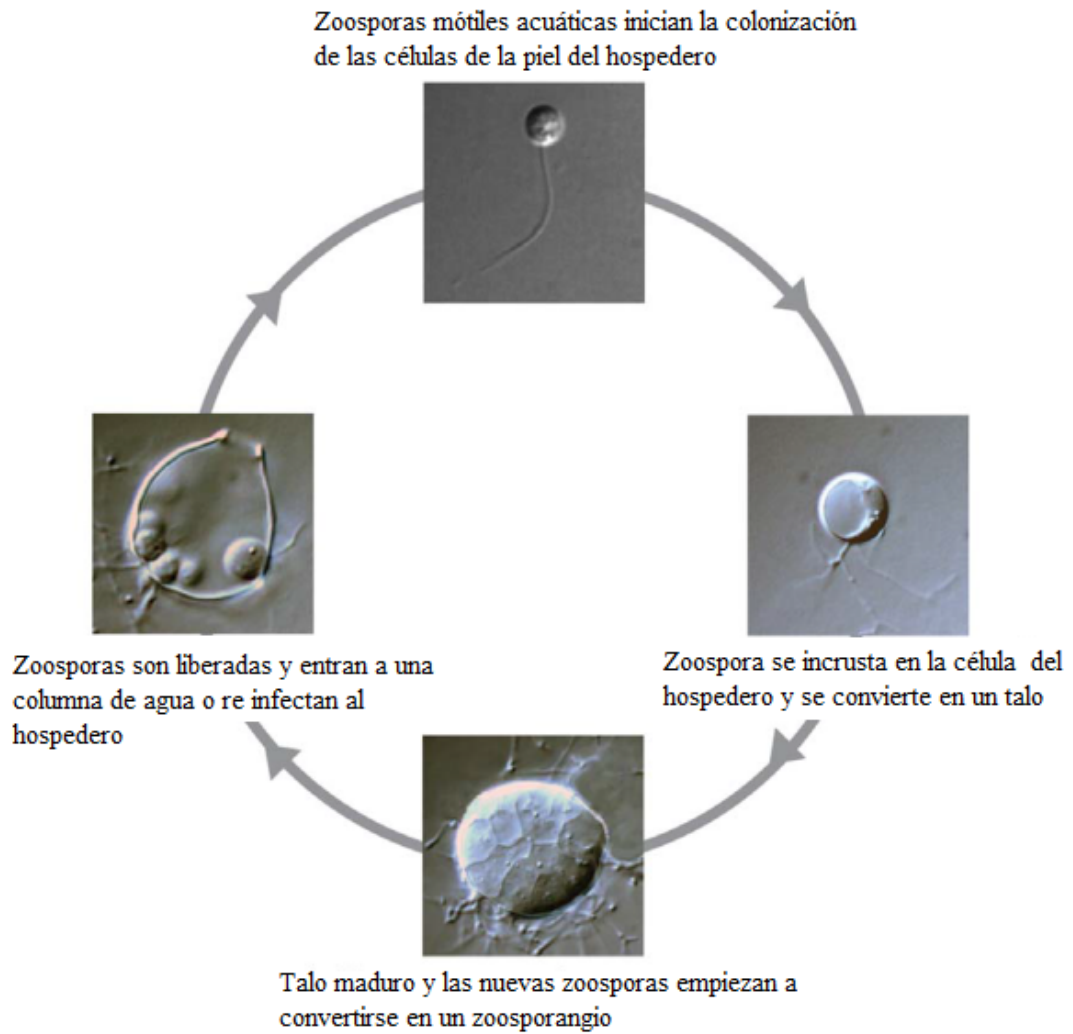


Figura 1. Ciclo de vida de *Batrachochytrium dendrobatidis* adaptado. Rosenblum et al., 2010

2.3 Enfermedad

La quitridiomycosis es una enfermedad infecciosa que tiene como agente causal el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis*. Es una infección micótica relacionada con la disminución y extinción de poblaciones de anfibios en todo el mundo (Kusrini, Skerratt, Garland, Berger y Enderwin, 2008).

2.3.1 Patogénesis

La piel de los anfibios difiere por varias características de la piel de otros vertebrados, en especial la permeabilidad y su fisiología activa siendo un órgano clave para el mantenimiento de la homeostasis. La piel anfibia es permeable al agua y es el sitio de intercambio iónico, electrolitos como el sodio, magnesio, potasio y gases (Voyles et al., 2011).

La colonización en las células de la piel del hospedero es el primer paso en la infección de quitridiomycosis. La epidermis está conformada por múltiples capas celulares, desde su interior a la superficie son: estrato germinativo, estrato espinoso, estrato granuloso y estrato córneo. La capa basal es el estrato germinativo donde se producen los queratinocitos los mismos que son atacados por *Batrachochytrium dendrobatidis* para su desarrollo en las capas más superficiales. Una vez en la piel de los anfibios, el talo maduro ingresa a las células del estrato granuloso y córneo donde se desarrolla el zoosporangio en el interior de la célula (Voyles et al., 2011).

Aquí, las zoosporas se dividen de manera asexual continuando el ciclo donde la liberación de nuevas zoosporas a la superficie provoca un engrosamiento de la piel, hiperplasia e hiperqueratosis del estrato córneo y estrato granuloso de los anfibios, degeneración citoplasmática y vacuolización en células dispersas en las capas más profundas. Esto afecta directamente, debido a que mediante la piel regulan el funcionamiento del intercambio de gases respiratorios y agua provocando un desequilibrio osmótico y la reducción en las concentraciones de electrolitos plasmáticos que llevan al deterioro del funcionamiento eléctrico cardíaco (paro cardíaco) y la muerte (Ruiz y Rueda, 2008; Rosenblum et al., 2010; Voyles et al., 2011).

Los signos clínicos de los individuos son letargia, pérdida de apetito, eritema cutáneo, postura anormal, desprendimiento de piel (Voyles et al., 2011).

2.3.2 Respuesta de los anfibios a la quitridiomycosis

Las salamandras, ranas y cecilias tienen piel húmeda la cual suministra de forma continua el moco secretado de las glándulas con el fin de evitar la desecación y promover el consumo de oxígeno eficiente a través de su piel. La capa de moco es importante en la retención de humedad porque actúa como termorregulación y en la defensa de patógenos microbianos, conjuntamente las glándulas secretoras de moco producen secreciones que contienen carbohidratos los mismos que pueden servir como fuente de nutrientes para los patógenos (Lauer, Simon, Banning, Lam y Harris, 2008).

La piel de todos los vertebrados puede desarrollar respuestas inmunes adaptativas, es decir el patógeno es reconocido por las células presentadoras de antígeno las cuales activan la respuesta humoral o celular. En el caso de los anfibios la falta de linfocitos en la piel infectada con el quitridio sugiere que la respuesta celular es pobre frente a *B. dendrobatidis* y aún no hay evidencia de respuesta humoral, por lo tanto las defensas innatas son de importancia tales como las barreras epiteliales, células fagocíticas, macrófagos, células dendríticas y péptidos antimicrobianos. (Melzer y Bishop, 2009; Woodhams et al., 2007).

Las bacterias que viven formando parte de la piel de anfibios como biota residente han co-evolucionado con las especies de anfibios han desarrollado mecanismos de protección contra estos péptidos antimicrobianos. Por esta razón las bacterias ahora son vistas como mutualistas y juegan un papel esencial en la supervivencia de su hospedero. Al mismo tiempo, se espera que estas bacterias simbiotas tengan la capacidad de producir metabolitos antimicrobianos contra otras especies microbianas con las que compiten, consecuentemente los anfibios, como sus anfitriones, podrían beneficiarse de la capacidad de una bacteria para producir tales compuestos antimicrobianos o antifúngicos en caso de una infección con un microorganismo patógeno. Por lo tanto, la producción de compuestos antifúngicos de los miembros de la microbiota cutánea de anfibios puede convertirse en un vía adicional

para la respuesta innata de protección contra los microorganismos patógenos (Lauer et al., 2008).

Es muy amplia la variación de respuestas de las especies, poblaciones e individuos a *Batrachochytrium dendrobatidis*. Las tasas de mortalidad varía de 0-100% dependiendo de la especie, la temperatura, y la edad del anfibio (Rosenblum et al., 2010).

Algunas de las respuestas que pueden tener las especies frente al patógeno son que (1) algunas especies son portadoras del hongo con poca o ninguna evidencia de mortalidad o de disminución en sus poblaciones, mientras otras desaparecen con la presencia de *B. dendrobatidis*, y especies aunque son sensibles a la enfermedad no experimentan mortalidad incluso cuando albergan individuos infectados. (2) La mortalidad asociada a quitridiomycosis se presenta en estadios de vida temprana, modelos matemáticos muestran mayor tolerancia a la infección por las ranas adultas que en los estadios anteriores donde la mortalidad es casi completa. (3) La quitridiomycosis ocurre también en localidades que no son consideradas optimas para el crecimiento y reproducción del hongo, lo cual indica que la tolerancia del huésped a la exposición y / o infección con *B. dendrobatidis* se rige de manera intrínseca, así como factores extrínsecos (Lauer et al., 2008).

2.4 Efecto antimicótico

2.4.1 Importancia en la identificación de bacterias con efecto *anti-Bd*

Se han propuesto alternativas para la eliminación de este hongo que afecta a las poblaciones anfibias como: la cuarentena del animal, la vacunación, la fumigación con antifúngicos en áreas de cría y en ambientes naturales pero son difíciles de aplicar a gran escala o para la prevención de los brotes en lugares de difícil acceso tomando en cuenta que la aplicación de químicos antifúngicos en la naturaleza puede tener efectos negativos en hongos nativos asociados a plantas y en el equilibrio del ecosistema (Harris et al., 2009b). Consecuentemente, se potencializa el control de la quitridiomycosis con un tratamiento antifúngico más específico.

Debido a que todas las plantas y animales albergan microorganismos simbioses que tienen un rol vital en la salud de sus hospederos, y además existe cierta especificidad entre la comunidad microbiana simbiote y el hospedero, se conoce que si se compara distintos huéspedes simpátricos, la especificidad de los simbioses puede tener un papel en la resistencia para los patógenos en cada hospedero (McKenzie, Bowers, Fierer, Knight y Lauber, 2011).

Se confirma así que los microorganismos cutáneos son parte del sistema inmune innato de los anfibios y la estructura de la comunidad microbiana en la piel de los anuros es un factor determinante en la evolución de la enfermedad. Además, la alteración de las interacciones microbianas en la piel de anfibios puede prevenir un resultado letal de esta enfermedad (Harris et al., 2009a).

Por lo tanto, uno de los hallazgos para la atenuación de la enfermedad es la identificación de bacterias, las mismas que son encontradas como microbiota natural de la piel de los anfibios y son productoras de metabolitos antifúngicos con la finalidad que se usen como tratamientos probióticos en las poblaciones. (Fisher et al., 2009).

Experimentos aleatorios confirman que si se aumentan bacterias con capacidad antifúngica a *Batrachochytrium dendrobatidis* (bacterias *anti Bd*), como la cepa *Janthinobacterium lividum* que normalmente se encuentra en la piel de ciertos anfibios

se contrarresta el efecto del hongo mediante la producción del metabolito antifúngico violaceína (Harris et al., 2009a; Becker et al., 2009).

El metabolito violaceína existe en la piel de individuos no colonizados por *J. lividum*, esto sugiere que no solo un género bacteriano produce los metabolitos que inhiben al patógeno (Brucker et al., 2008a). La producción de otro metabolito inhibidor contra *B. dendrobatidis* lo corrobora el mismo autor con la identificación del compuesto 2,4-diacetilfloroglucinol (2,4-DAPG) producido por la bacteria *Lysobacter gummosus* aislada de la piel de la salamandra *Plethodon cinereus* (Brucker et al., 2008b). Por tanto, es importante el aislamiento de distintas bacterias y probar el posible efecto antifúngico contra el patógeno.

Janthinobacterium lividum es una bacteria que en ensayos de laboratorio inhibe a *B. dendrobatidis* exitosamente, esta cepa fue aislada de la salamandra *Hemidactylium scutatum*. El experimento de Becker et al, 2009 consistió en inocular esta bacteria en la piel de las salamandras *Plethodon cinereus* y se comprobó su buen establecimiento, aumentando considerablemente la producción de violaceína y consecuentemente la supervivencia del 100% (16/16) de las salamandras que recibieron el tratamiento.

Una investigación en anuros, de igual manera inoculó *Janthinobacterium lividum* en la piel de *Rana muscosa* no infectadas con *Batrachochytrium dendrobatidis*. Los tres distintos tratamientos consisten en (1) anuro expuesto directamente a las zoosporas de *B. dendrobatidis*, (2) anuro expuesto a *J. lividum* y (3) anuro expuesto a las zoosporas de *B. dendrobatidis* y a *J. lividum*. Los resultados demuestran que la bioaumentación de la bacteria incrementa el metabolito y previene la morbilidad y mortalidad causada por el hongo (Harris et al., 2009a).

Por otro lado, en Panamá se inoculó *Janthinobacterium lividum* en la piel de *Atelopus zeteki*, una población recientemente afectada por una epidemia de quitridiomycosis, en busca de un tratamiento de protección. Los tratamientos aplicados en *Atelopus zeteki* fueron (1) exposición a 3 000 zoosporas de *B. dendrobatidis* diluidas en 225 mL de agua en osmosis inversa, (2) exposición a 1.1×10^7 células de *J. lividum* adicionando la misma cantidad de zoosporas y mL de agua en osmosis reversa, (3)

exposición a el mismo número de *J. lividum* antes de ser expuesto a las zoosporas de *B. dendrobatidis*, (4) exposición a agua sin microorganismos (control). El estudio concluye que existe una buena colonización de *J. lividum* en la piel de *Atelopus zeteki* pero es temporal puesto que dos semanas después del tratamiento declina el número de células de la bacteria y se incrementan las zoosporas resultando la muerte de los anuros (Becker et al., 2012).

En Estados Unidos el estudio de Lam et al. (2009) señala que existen poblaciones de anfibios en declive que poseen un número de bacterias *anti-Bd* similar a las poblaciones que persisten sin aparente efecto nocivo del hongo patógeno. Otro aspecto importante a señalar es que las especies estudiadas son simpátricas, lo cual sugiere la importancia que la inoculación y bioaumentación de las bacterias antimicóticas sea previa a la exposición del patógeno para un efectivo control de la morbilidad y mortalidad de esta enfermedad pese a las diferentes condiciones de los anfibios.

Los estudios anteriormente mencionados evidencian que la adición de las bacterias *anti Bd* disminuye la severidad y la susceptibilidad a la quitridiomycosis en los individuos infectados. Sin embargo, la selección de microbiota adecuada juega un papel fundamental y es importante que los aislamientos y estudios futuros se realicen con bacterias de la misma zona de donde proviene el anfibio las cuales podrían ser más compatibles con los mismos (Daskin y Alford, 2012).

Concluyendo que una estrategia de bioaumentación puede ser un instrumento eficaz de gestión para controlar la quitridiomycosis en poblaciones de anfibios para su aseguramiento de supervivencia en la naturaleza. (Harris et al., 2009a).

CAPÍTULO III

Marco Metodológico

3.1 Tipo de Estudio

Es un estudio descriptivo/ trasversal que se llevó a cabo en el Centro de Investigaciones de Citogenética y Biomoléculas de Anfibios (CICBA) de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE), con las muestras de hisopados de piel de anuros colectados en la localidad de Morán (Provincia del Carchi).

El estudio en mención formó parte del Proyecto de Investigación “El rol de las bacterias y péptidos de la piel de anfibios en la resistencia hacia la enfermedad infecciosa quitridiomycosis” que corresponde al código J13129 financiado por la PUCE.

3.2 Población

La población evaluada fueron las bacterias aisladas de la piel de anuros.

3.3 Criterios de inclusión

Es estudio incluye a todos los distintos morfotipos aislados del hisopado de la piel de los anuros.

3.4 Limitaciones del estudio

Existen bacterias no cultivables las cuales pueden tener inhibición al *Batrachochytrium dendrobatidis*.

3.5 Diseño del Experimento

El presente estudio se realizó en seis etapas:

- Primera etapa: Lavado de individuos donde se realizó el hisopado para la obtención de bacterias de la piel de los anfibios.
- Segunda etapa: Diluciones y siembra en medios de cultivo R2A para el aislamiento y purificación de distintos morfotipos aislados.
- Tercera etapa: Preservación de cepas bacterianas aisladas.
- Cuarta etapa: Pruebas de antagonismo de todas las cepas bacterianas aisladas frente al hongo patógeno *Batrachochytrium dendrobatidis* (Cepa JEL 423)
- Quinta etapa: Medición de halos de inhibición de las bacterias que presentan efecto *anti- Bd*.
- Sexta Etapa: Identificación molecular de las cepas bacterianas con efecto *anti- Bd*.

3.6 Equipos y materiales

3.6.1 Equipos

- Incubadora; Marca y Modelo: MMM Medcenter Einrichtungen GmbH.
- Termobloque; Marca y Model: Dry Block Heating Thermostat BOECO Bio TDB-100.
- Micro centrífuga; Marca y Modelo: 16M Labnet
- Vortex; Marca y Modelo: LABNET VX 100.
- Nanodrop; Marca y Modelo: Thermo Scientific Nanodrop 1000.
- Ultracongeladora, Marca y Modelo: Sanyo MDF-U53VC.
- Cabina de Bioseguridad Clase II, Tipo 2A; Marca y Modelo: LABGARD Class II Type EF/SB.
- Microscopio Óptico; Marca y Modelo: Carl Zeiss Primo Star

3.6.2 Materiales

- Pipetas automáticas de volumen variable
- Puntas para pipetas con filtro volumen 0.1-10uL.
- Puntas para pipetas con filtro volumen 100uL.
- Puntas para pipetas con filtro volumen 1000uL.
- Microtubos volumen 1.5mL.
- Guantes de Nitrilo.
- Marcadores.
- Cajas de Petri de 60mm.
- Botellas de 1000mL de vidrio.
- Parafilm.
- Agar Nutritivo 500g.
- Solución DS (Ver Anexo 1).
- Medio de Cultivo R2A (Ver Anexo 1).
- Agar Triptona 500g
- Alcohol antiséptico (96%).
- Cloro (5%)
- Glicerol 100 mL.
- Tubos Falcon de 15 mL.

3.7 Técnica

3.7.1 Protocolo para aislamiento bacteriano de la piel de anuros y pruebas de antagonismo frente a *Batrachochytrium dendrobatidis*

Se aplicó el protocolo reportado por de Flechas (2012) con modificaciones realizadas por la Lcda Ailin Blasco, investigadora del Laboratorio CICBA-PUCE.

La recolección de las muestras lo realizó el equipo de investigadores del CICBA mediante el protocolo con modificaciones adaptadas de la siguiente manera:

3.7.1.1 Lavado de Individuos:

- a. Lavar con 20 mL de agua destilada las ranas, para esto utilizamos una jeringa.
- b. Realizar frotis con un hisopo sobre el vientre, lados, patas y membranas interdigitales. Se hacen 5 pasadas en cada una de las zonas. (Ver Figura 2).



Figura 2. Zonas de muestreo en los anuros para la obtención de bacterias encontradas en piel. Flechas, (2012).

- c. Almacenar los hisopos en tubos de 2mL con 1mL de solución DS (Solución similar al agua de charca). Mantener los tubos a temperaturas bajas (alrededor de 4°C).
- d. Refrigerar las muestras tan pronto sea posible.

Tabla 1. Anuros muestreados por el equipo del CICBA.

Código de Laboratorio	Género	Especie	Serie Campo	Localidad	Provincia
PB-1	<i>Hyloxalus</i>	<i>dalatorreae</i>	SC26915	Morán	Carchi
PB-2	<i>Hyloxalus</i>	<i>dalatorreae</i>	SC27249	Morán	Carchi
PB-3	<i>Hyloxalus</i>	<i>dalatorreae</i>	SC27248	Morán	Carchi
PB-4	<i>Hyloxalus</i>	<i>dalatorreae</i>	SC27250	Morán	Carchi
PB-5	<i>Hyloxalus</i>	<i>dalatorreae</i>	SC27251	Morán	Carchi
PA-1	<i>Hyloscirtus</i>	<i>larinopygion</i>	SC26913	Morán	Carchi
PA-2	<i>Hyloscirtus</i>	<i>larinopygion</i>	SC26912	Morán	Carchi
PC-1	<i>Pristimantis</i>	<i>sp.</i>	SC26917	Morán	Carchi
PC-2	<i>Pristimantis</i>	<i>sp.</i>	SC26916	Morán	Carchi
PD-1	<i>Pristimantis</i>	<i>pyrrhomerus</i>	SC26909	Morán	Carchi
PD-2	<i>Pristimantis</i>	<i>pyrrhomerus</i>	SC26910	Morán	Carchi
PD-3	<i>Pristimantis</i>	<i>pyrrhomerus</i>	SC26911	Morán	Carchi

Fuente CICBA, 2013

Posteriormente las diluciones y siembra en medios de cultivo R2A fueron realizadas por la autora con referencia del mismo protocolo y las modificaciones establecidas para el CICBA.

3.7.1.2 Diluciones y siembra en medios de cultivo R2A:

- a. Realizar las respectivas diluciones a tubos de 900 μ L de solución DS. Siempre se debe colocar el tubo que contiene el hisopo en Vortex antes de transferir los 100 μ L de dilución en medio R2A. Realizar esto por duplicado. (Ver Figura 3).

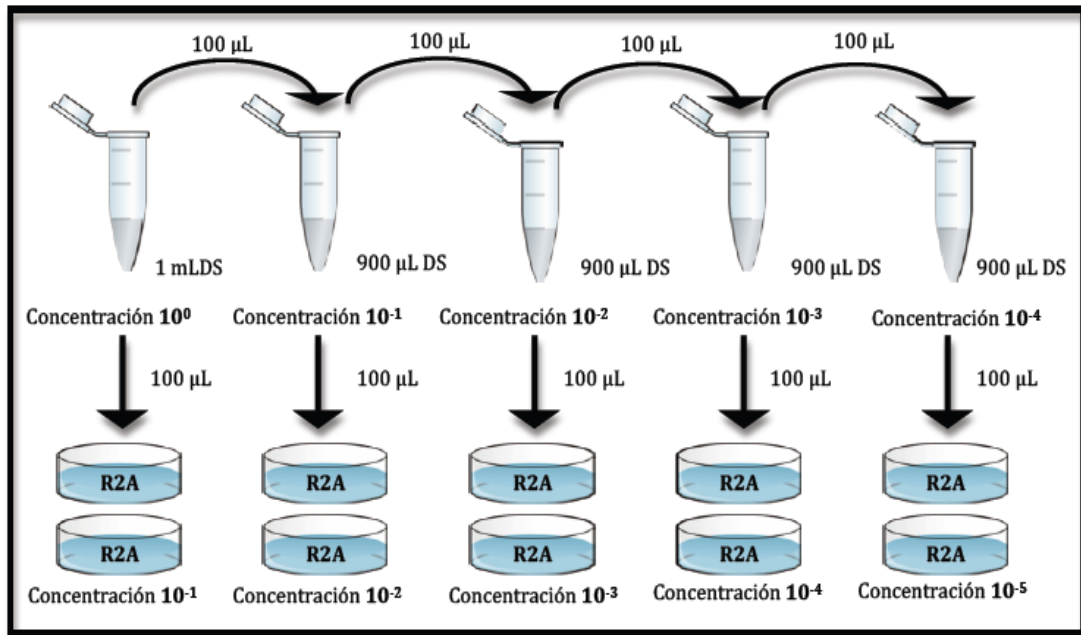


Figura 3. Esquema de diluciones en DS y siembra en R2A. Flechas, (2012).

Se realizan diluciones con el fin de poder recuperar colonias más definidas y separadas. Se recomienda realizar diluciones con concentraciones hasta 10^{-4} o 10^{-5} sin omitir un gran número de morfotipos que logren identificarse posteriormente (Ver Figura 4).

- b. Incubar los medios a 23°C.
- c. Revisar periódicamente para identificar rápidamente la aparición de diferentes morfotipos (en especial en los medios con las mayores diluciones).

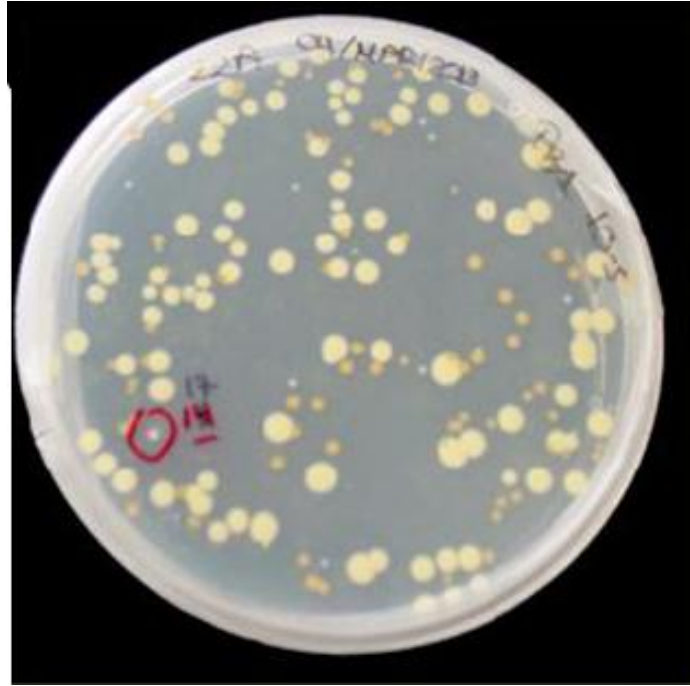


Figura 4. Distintos morfotipos aislados de la dilución 10^5 en medio R2A.

- d. Realizar la descripción de cada uno de los morfotipos identificados en base al libro de Seeley y Vandemark (1981) (tamaño, bordes, textura, color, etc.) (Ver Anexo 2 y Anexo 3) y con un palillo estéril realizar una punción del morfotipo y transferirlo a un cuadrícula de un medio R2A o de Agar Nutritivo nuevo (ver Figura 5). Se sugiere utilizar una caja por dilución realizada con el fin de evitar confusión de muestras de individuos.

RECOMENDACIÓN: En todas las cajas se debe escribir la fecha y el número de muestra.

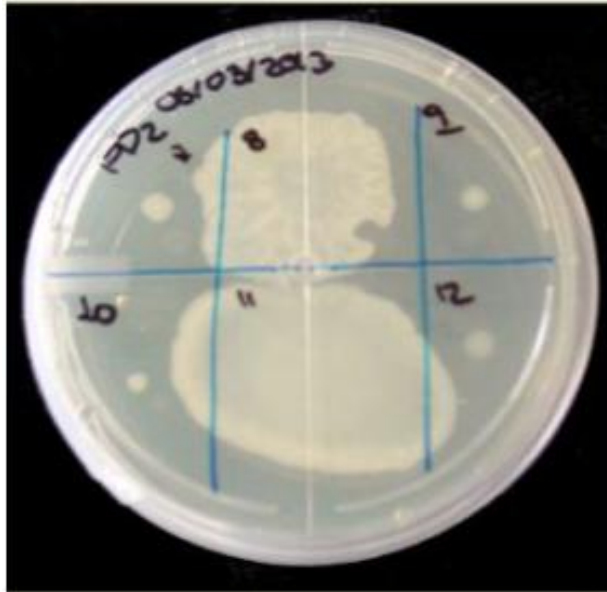


Figura 5. Aislamiento de morfotipos bacterianos en cuadrícula en Agar Nutritivo.

- e. Una vez que se obtuvo un morfotipo aislado, cada uno fue sembrado por aislamiento en media caja de petri con Agar Nutritivo (Ver Figura 6). Antes de realizar los pasos b y c, se debe esterilizar el asa.

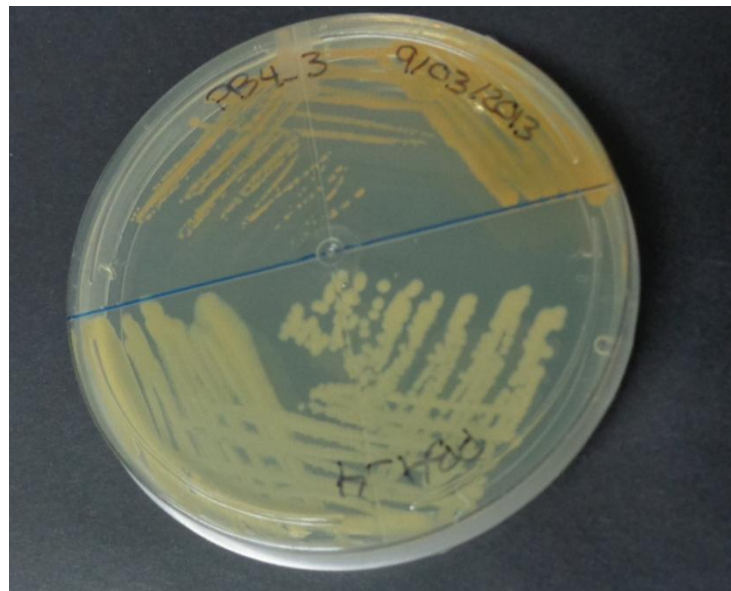


Figura 6. Morfotipos aislados y purificados en Agar Nutritivo.

- f. Incubar las cajas a 23°C y revisar el crecimiento de las bacterias periódicamente.
- g. Una vez se obtuvo el crecimiento de colonias puras y simples, se sembró por aislamiento una sola colonia en una caja de Petri con Agar Nutritivo con el mismo mecanismo de siembra presentado en el punto e.
- h. Incubar las cajas a 23°C y revisar su crecimiento cada 12 a 24 horas.

3.7.1.3 Preservación de cepas bacterianas (Flechas, 2012)

Las bacterias se deben preservar en tubos con caldo nutritivo con 20% de glicerol.

- a. Usando un hisopo, recoger todas las colonias presentes en la caja y transferirlas (por suspensión) a un tubo Eppendorf de 1,5mL el cual contiene 1mL de caldo nutritivo con 20% de glicerol.
- b. Congelar los tubos a -80°C (sin hisopo) (Ver Figura 7).



Figura 7. Criopreservación de morfotipos.

3.7.1.4 Pruebas de antagonismo

Todo el proceso se realiza en cámara de flujo laminar. Antes de comenzar cada proceso dejar en UV por 30 minutos.

- a. Para realizar un ensayo con 10 morfotipos se deben preparar 22 cajas de medio Agar Triptona 1%. Cada bacteria tiene 2 réplicas. Si se van a probar más bacterias se debe calcular: #bacterias x 2 + 2 controles negativos. Un tubo falcón por control.
- b. En dos tubos falcón repartir 22 mL de agua estéril (16 y 17 mL) o según el número de bacterias que se van a probar.
- c. El cultivo del hongo debe estar activo. Desprender todo el material fúngico y poner el hongo en el tubo falcón. Debe haber una buena cantidad de hongo para que en las cajas se forme un tapete homogéneo.
- d. Para sembrar el hongo y para evitar diferencias marcadas en la cantidad de hongo que se sirve por caja, con la pipeta se mezcla dos veces antes de tomar 1 mL, se repite el proceso cada vez que se dispensa la solución.
- e. En cada caja con medio Agar Triptona 1% se sirve 1 mL de la solución. Con cuidado se mueve la caja para que la solución cubra toda la superficie.
- f. Las cajas se dejan destapadas (total o parcialmente) para que se seque el excedente de agua alrededor de 45 min. No se debe dejar secar demasiado porque el hongo muere.
- g. Cuando las cajas ya estén lo suficientemente secas, con un palillo estéril se toma una colonia de la bacteria a probar y se siembra en una línea al igual que el control negativo (*Escherichia. coli* ATCC 35218).
- h. Las cajas deben estar marcadas con: la fecha, la bacteria que se está probando, el número de la réplica.
- i. Se incuban a 23°C y se revisan diariamente por los 5 días siguientes.
- j. Tomar fotos de las cajas en las que se evidencie el halo de inhibición (Ver Figura 8, 9,10 y11).

Posteriormente a cada morfotipo que evidenció inhibición se le realizó una tinción de Gram. (Ver Figura 12 y Anexo 4).

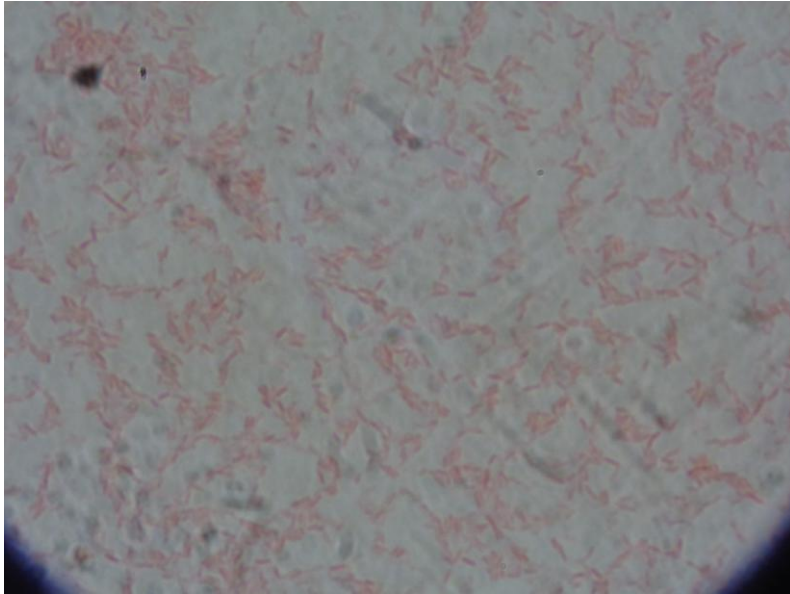


Figura 12. Tinción Gram del morfotipo PB4-2 en 100X.

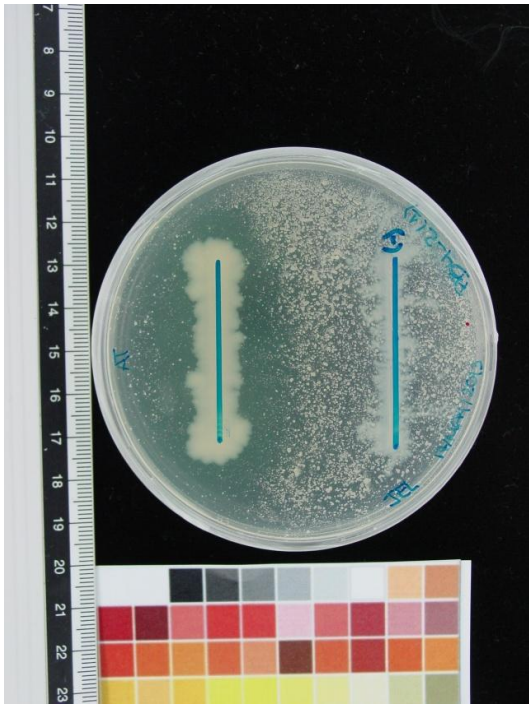


Figura 8: Morfotipo PB4-2
repetición 1, día 3.

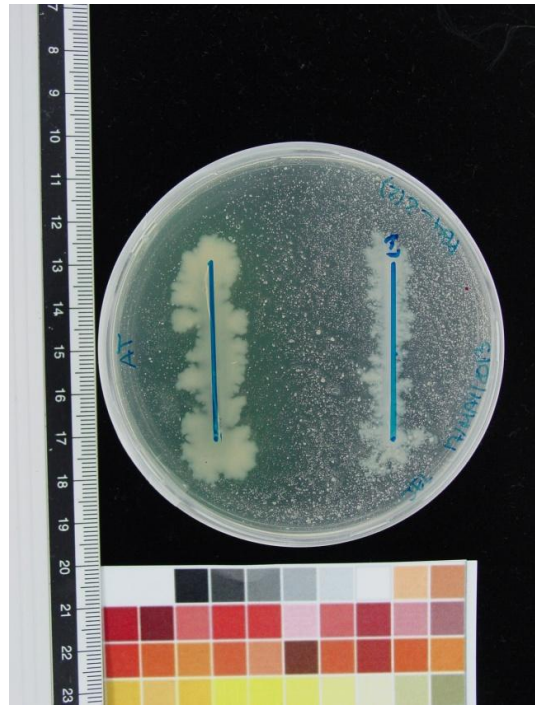


Figura 9: Morfotipo PB4-2
repetición 2, día 3.



Figura 10: Morfotipo PB4-2
repetición 1, día 5.

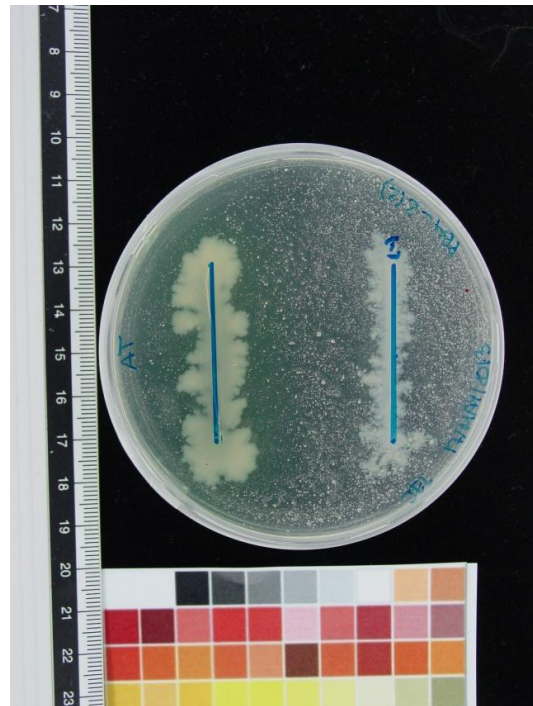


Figura 11: Morfotipo PB4-2
repetición 2, día 5.

3.7.1.5 Medición de halos de inhibición

Se realizó la medición de los halos de todos los morfotipos que presentaron inhibición en los ensayos de antagonismo aplicando el protocolo sugerido y realizado por la Lcda. Ailin Blasco mediante el programa Image J (Ver Anexo 5). Este programa nos proporciona por cada morfotipo medido el valor de un área la cual está determinada por la distancia que existe entre el control negativo y el morfotipo probado; además el Image J nos proporciona otro valor llamado media el cual corresponde a la media de los pixeles en la escala de grises que mide el programa.

3.7.1.6 Identificación molecular de bacterias *anti-Bd*

1. Se realizó la extracción de ADN mediante denaturación por calor en el termobloque (Ver Anexo 6).
2. Se cuantificó la cantidad y cantidad de ADN en el nanodrop donde la pureza de ADN en la relación A260/280 debe ser igual o mayor a 1.8 para enviar a secuenciar (Ver Anexo 7).
3. Envío de ADN a Macrogen Inc. (Seul Corea) para su amplificación, secuenciación y purificación.
4. E análisis de secuencias fue realizada por el MSc Pablo Menéndez quien mediante la secuenciación del gen 16S rRNA de los datos de las secuencias de ambos cebadores obtuvo una secuencia consenso a través del ensamblaje y edición de las mismas en el programa Geneious Pro v.5.6.3 (Biomatters, 2005-2012). Las secuencias fueron alineadas en la interfase de Geneious Pro con el programa MAFFT.

3.8 Control de calidad

El control negativo del ensayo de antagonismo fue *Escherichia coli* ATCC 35218 y el control de esterilidad se realizó con cintas con viraje de color en todo el material a utilizar.

3.9 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante el programa SPSS V16.0, en el cual se llevaron a cabo las siguientes pruebas:

- Prueba de Normalidad: donde verificamos la hipótesis de normalidad necesaria en el conjunto de datos para que el resultado de algunos análisis sea fiable, como por ejemplo para el Análisis de la Varianza (ANOVA).
- ANOVA: Es una técnica estadística de contraste de hipótesis y nos permite determinar si las diferencias que existen entre las medias de tres o más grupos (niveles de clasificación) son estadísticamente significativas.
- Análisis de la Covarianza (ANCOVA), es una extensión del análisis de la varianza, permite ajustar los estimadores del efecto de un tratamiento según posibles covariables y factores.

Es una técnica estadística que combina ANOVA (pues compara medias entre grupos) y análisis de regresión (ajusta las comparaciones de las medias entre los grupos por variables continuas o covariables).

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Resultados

4.1.1 Resultados de total de morfotipos bacterianos aislados

Se analizó un total de 12 anuros que corresponden a 4 distintas especies de anfibios y se obtuvieron un total de 147 morfotipos bacterianos aislados; y la especie *Hyloxalus dalatorreae* presenta el mayor número de morfotipos (Ver Gráfico 1).

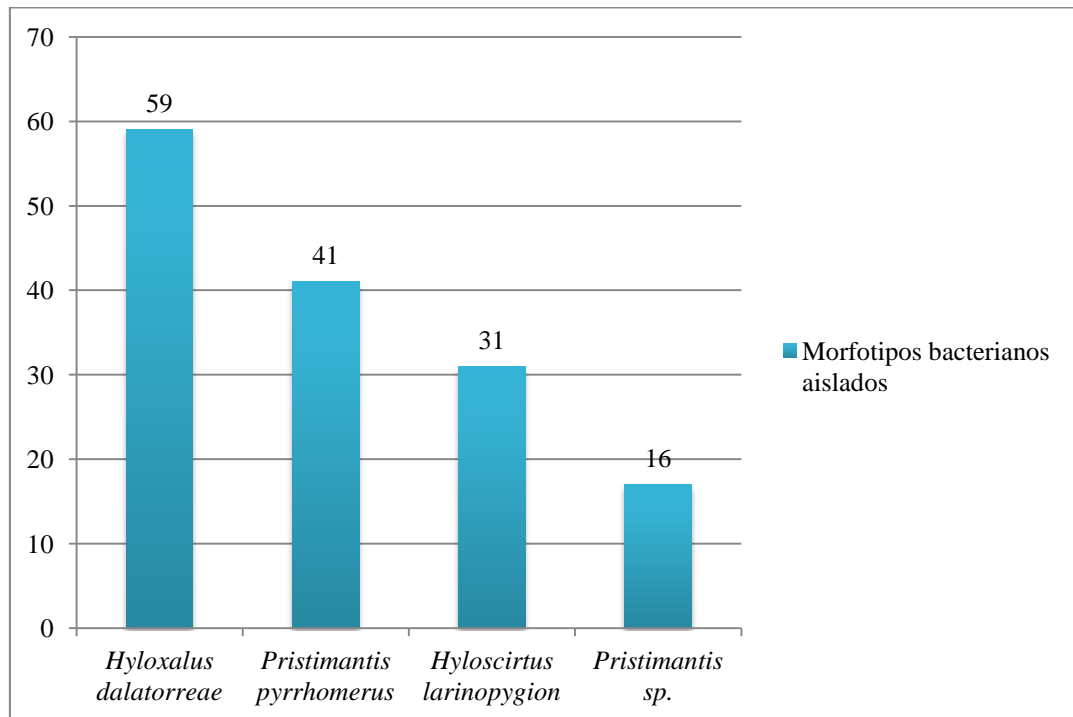


Figura 13. Total de morfotipos bacterianos aislados

4.1.2 Resultados de la evaluación *in vitro* del efecto antimicótico de las bacterias aisladas

Al realizar los ensayos de antagonismo de los 147 morfotipos aislados frente al hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* se obtienen un total de 67 (45,57%) morfotipos que presentan inhibición al patógeno de los cuales 25 corresponden a *Pristimantis pyrrhomerus* (Ver Figura 14).

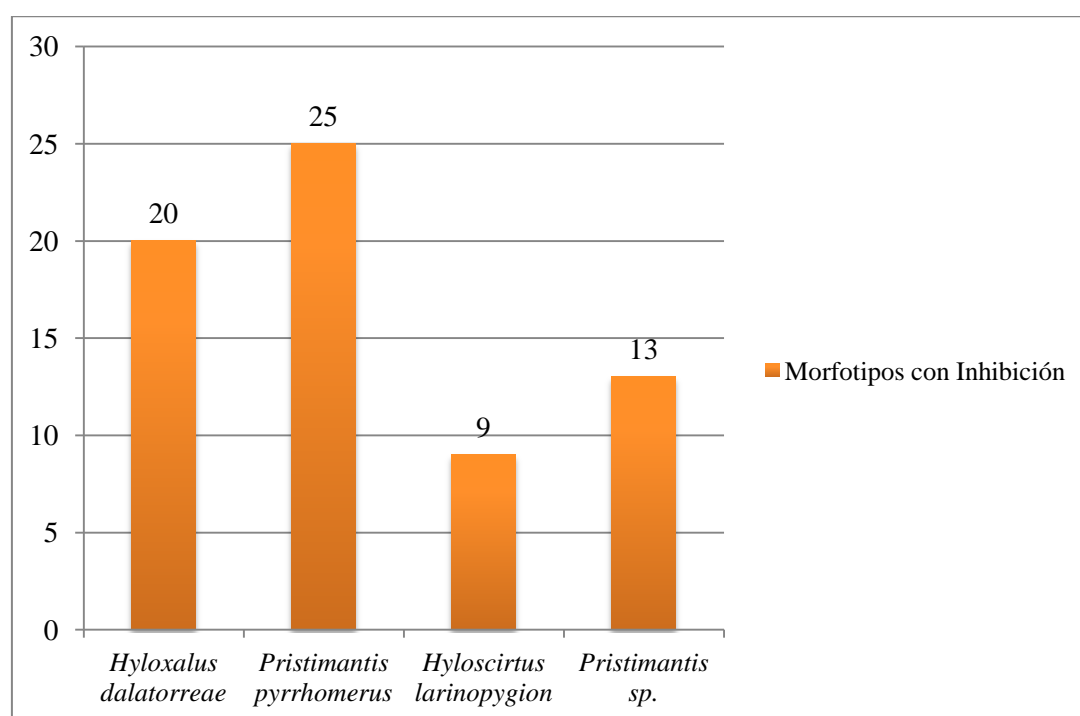


Figura 14. Total de morfotipos bacterianos con inhibición

4.1.3 Resultados de la Prueba de Normalidad, ANOVA y ANCOVA.

Para verificar la normalidad de los datos se realizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov que dio como resultado que dichos valores siguen una distribución normal de acuerdo al valor de la significancia bilateral con un valor de 0.999 ($p > 0.05$) (Ver Tabla 2), por lo que se puede realizar posteriormente el ANOVA.

Tabla 2. Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra

		Media
N		126
Parámetros Normales ^a	Media	112.30453
	Desviación Estándar	12.833250
Mayoría de las Diferencias Extremas	Absoluta	.033
	Positiva	.033
	Negativa	-.025
Z de Kolmogorov-Smirnov		.376
Sig. asintót. (bilateral)		.999

a. Test de distribución es Normal.

El Análisis de la Varianza (ANOVA) nos permitió determinar que las diferencias que existen en al menos uno de los grupos de especies anfibias son estadísticamente significativamente de los demás ($p \leq 0.05$) (Ver Tabla 3 y Gráfico 9).

Tabla 3. ANOVA de valores de la media de los pixeles en la escala de grises obtenida de la medición del Image J.

ANOVA					
Media					
	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Media Cuadrática	F	Sig.
Entre Grupo	3181.294	3	1060.431	7.433	.000
Dentro de Grupos	17405.244	122	142.666		
Total	20586.538	125			

A continuación se realizó el ANCOVA con el área obtenida del Image J como variable controlada o covariable y dio como resultado que es estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$) al igual que el ANCOVA (Ver Tabla 4).

Tabla 4. ANCOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Media Cuadrática	F	Sig.
Modelo	1.594E6 ^a	5	318748.564	2411.364	.000
Area	1410.736	1	1410.736	10.672	.001
Sp	21518.826	4	5379.707	40.698	.000
Error	15994.508	121	132.186		
Total	1609737.327	126			

a. R cuadrada = ,990 (R Cuadrada Ajustada = ,990)

Posterior al análisis del ANOVA se realizó un diagrama de cajas para determinar las diferencias de las medias de los pixeles en la escala de grises obtenida del programa Image J dando como resultado que *Pristimantis pyrrhomerus* tiene el menor valor en la media de los pixeles en la escala de grises y por lo tanto la mayor inhibición. Por otro lado, *Pristimantis sp.* tiene el mayor valor de la media de los pixeles en la escala de grises y por lo tanto la menor inhibición (Ver Figura 15).

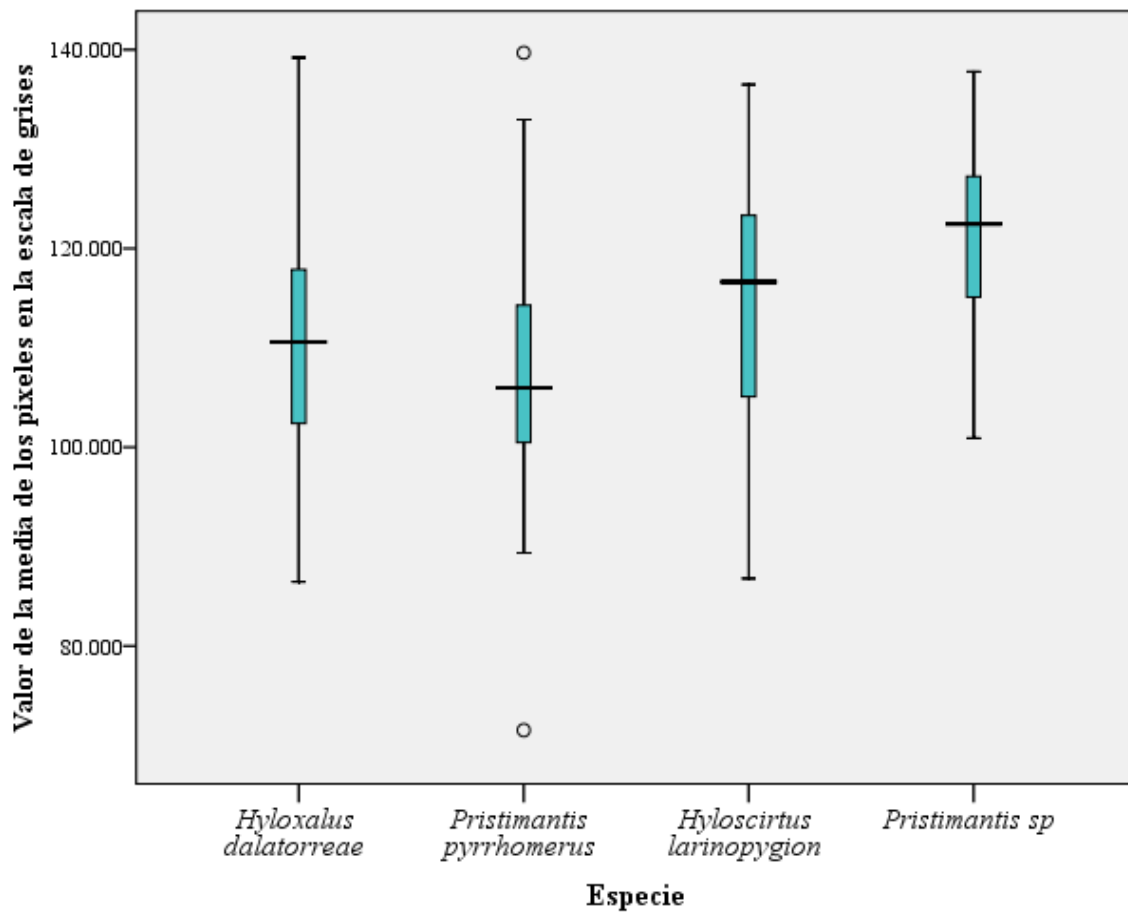


Figura 15. Diagrama de cajas de la media de los pixeles en la escala de grises de las especies de anuros

4.1.4 Resultados de la tinción de Gram

Se realizó la tinción Gram de los 67 morfotipos que presentaron inhibición frente a *Batrachochytrium dendrobatidis* dando como resultado que un 85,07% de los morfotipos son gram negativos, y el 14,93% son Gram positivos (Ver Figura 16).

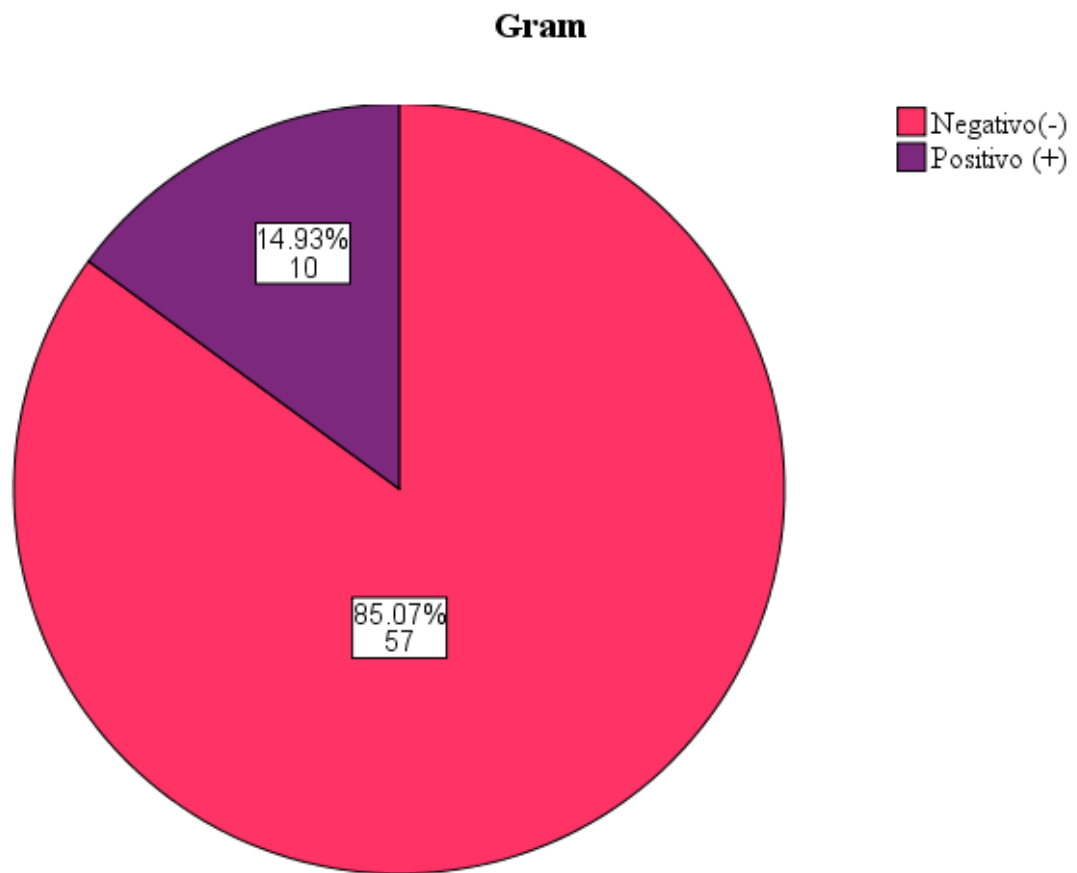


Figura 16. Resultado de tinción Gram de morfotipos inhibitorios

De la tinción Gram realizada a los 67 morfotipos con inhibición de acuerdo a la especie de anuro el mayor porcentaje en todas las especies corresponde a morfotipos Gram Negativos (Ver Figura 17).

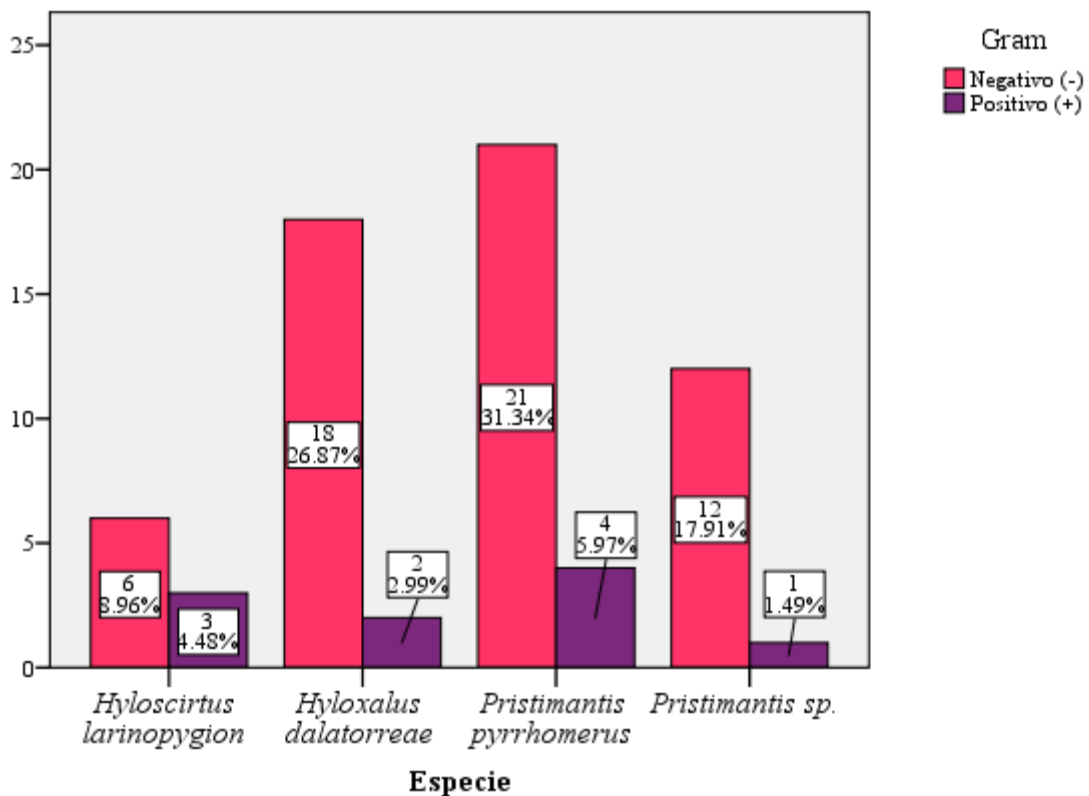


Figura 17. Resultado de tinción Gram por especie de Anuro

4.1.5 Resultados de la identificación molecular

Los resultados de la identificación molecular de los morfotipos que presentaron inhibición fue proporcionada por el Director del Proyecto el MSc. Pablo A. Menéndez-Guerrero. Dando como resultado que de la localidad Morán-Carchi se identificaron por algoritmo Blast un total 35 morfotipos y la mayor parte pertenecen al Género *Pseudomonas* (Ver Tabla 5).

Tabla 5. Identificación molecular de morfotipos bacterianos inhibitorios. Menéndez, 2013.

Especie	Morfotipo	Identificación Molecular
<i>Hyloscirtus larinopygion</i>	PA1-4	<i>Pseudomonas auricularis</i>
<i>Hyloscirtus larinopygion</i>	PA1-1	<i>Uncultured Rahnella sp.</i>
<i>Hyloscirtus larinopygion</i>	PA2-2	<i>Pseudomonas sp.</i>
<i>Hyloscirtus larinopygion</i>	PA2-7	<i>Uncultured Pseudomonas sp. clone VE6B07</i>
<i>Hyloscirtus larinopygion</i>	PA2-11	<i>Pseudomonas sp.</i>
<i>Hyloscirtus larinopygion</i>	PA2-18	<i>Pseudomonas reactans</i>
<i>Hyloscirtus larinopygion</i>	PA2-22	<i>Pseudomonas sp.</i>
<i>Hyloxalus dalatorreae</i>	PB1-7	<i>Pseudomonas sp.</i>
<i>Hyloxalus dalatorreae</i>	PB3-1	<i>Pseudomonas tolaasii</i>
<i>Hyloxalus dalatorreae</i>	PB3-6	<i>Uncultured Pseudomonas sp. clone 36</i>
<i>Hyloxalus dalatorreae</i>	PB4-6	<i>Pseudomonas tolaasii</i>
<i>Hyloxalus dalatorreae</i>	PB4-7	<i>Pseudomonas poae</i>
<i>Hyloxalus dalatorreae</i>	PB4-12	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>Hyloxalus dalatorreae</i>	PB4-14	<i>Pseudomonas poae</i>
<i>Hyloxalus dalatorreae</i>	PB5-1	<i>Pseudomonas auricularis</i>
<i>Hyloxalus dalatorreae</i>	PB5-9	<i>Uncultured Pseudomonas sp. clone DRL-1E</i>
<i>Hyloxalus dalatorreae</i>	PB5-14	<i>Pseudomonas sp.</i>
<i>Hyloxalus dalatorreae</i>	PB5-17	<i>Pseudomonas mandeli</i>

<i>Pristimantis sp.</i>	PC1-2	<i>Pseudomonas sp.</i>
<i>Pristimantis sp.</i>	PC1-8	<i>Pseudomonas poae</i>
<i>Pristimantis sp.</i>	PC2-1	<i>Pseudomonas sp.</i>
<i>Pristimantis sp.</i>	PC2-5	<i>Pseudomonas sp.</i>
<i>Pristimantis sp.</i>	PC2-6	<i>Pseudomonas poae</i>
<i>Pristimantis pyrrhomerus</i>	PD1-6	<i>Uncultured Bacterium</i>
<i>Pristimantis pyrrhomerus</i>	PD1-7	<i>Pseudomonas palleroniana</i>
<i>Pristimantis pyrrhomerus</i>	PD1-9	<i>Pseudomonas poae</i>
<i>Pristimantis pyrrhomerus</i>	PD2-4	<i>Bacterium ICN9</i>
<i>Pristimantis pyrrhomerus</i>	PD2-7	<i>Pseudomonas sp.</i>
<i>Pristimantis pyrrhomerus</i>	PD2-11	<i>Bacterium ICN9</i>
<i>Pristimantis pyrrhomerus</i>	PD2-16	<i>Pseudomonas sp. BR7-15</i>
<i>Pristimantis pyrrhomerus</i>	PD2-17	<i>Pseudomonas auricularis</i>
<i>Pristimantis pyrrhomerus</i>	PD3-3	<i>Bacterium ICN9</i>
<i>Pristimantis pyrrhomerus</i>	PD3-5	<i>Pseudomonas aspleni</i>
<i>Pristimantis pyrrhomerus</i>	PD3-9	<i>Uncultured Bacterium clone ncd75g05c1</i>
<i>Pristimantis pyrrhomerus</i>	PD3-11	<i>Uncultured Bacterium clone EDW07B003_70</i>

4.2 DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos demuestran que el número de individuos colectados por especie anfibia (Tabla 1) no se relaciona con el número de morfotipos bacterianos inhibitorios (Figura 14), puesto que la especie anfibia de la cual se colectaron tres individuos, *Pristimantis pyrrhomerus*, posee 25 morfotipos inhibitorios, a diferencia de *Hyloxalus dalatorreae* que con cinco individuos, solo tiene 20 morfotipos inhibitorios.

Varios estudios han demostrado que la presencia de bacterias con actividad antifúngica en la piel de los anfibios inhibe al hongo patógeno, disminuyendo la morbilidad y mortalidad de los individuos; y que la adición de estas bacterias parece reducir los efectos de la enfermedad en el huésped (Brucker et al., 2008a, Brucker et al., 2008b Harris et al., 2009a). Al igual que el resultado de esta investigación corroboran que la capacidad *anti-Bd* de las bacterias *in vitro* es exitoso (Rollins-Smith, Pask, Reinert y Woodhams, 2011). Sin embargo, como se conoce, si las bacterias son obtenidas de la misma localidad, al igual que en este caso de Morán-Carchi se podrían minimizar los riesgos asociados con este procedimiento y aumentar la efectividad del tratamiento probiótico (Flechas, Sarmiento, Cárdenas, Medina, Restrepo y Amézquita, 2012).

En el estudio de Flechas y colaboradores (2012), aislaron 148 morfotipos de bacterias cultivables de tres distintas especies de *Atelopus* de tierras bajas, de las cuales el 26% presentó inhibición. En la presente investigación se aislaron 147 morfotipos de cuatro especies de anfibios de tierras altas de los cuales el 45,57% presentó inhibición; lo cual sugiere que aunque la mayor parte de declines de poblaciones se encuentren en tierras altas (Piotrowski , Annis y Longcore, 2004) no obstante allí, hay un mayor porcentaje de morfotipos con inhibición frente al hongo. Esto sugiere que la comunidad bacteriana de los anuros podría ser el resultado de un periodo crítico de selección natural frente a la quitridiomycosis, donde tanto sapos como el hongo patógeno coexisten (Flechas et al., 2012).

Por otro lado, en esta investigación en todas las especies anfibias de todos los morfotipos con inhibición se tiene prevalencia del género bacteriano *Pseudomonas*, evidenciado en lo obtenido en tinción de Gram, donde la mayor parte de los morfotipos son Gram Negativos. Este hallazgo también fue reportado por Flechas et al. (2012) en *Atelopus* y Lam et al. (2010) en *Rana muscosa*, *R. sierrae*, y en *Hyalinobatrachium*

colymbiphyllum donde encontraron que las cepas bacterianas del género *Pseudomonas* eran residentes comunes de la microbiota de la piel, mostrando fuerte inhibición del crecimiento de *B. dendrobatidis*. En procesos de estrés o por defensa a un microorganismo patógeno las bacterias producen metabolitos inhibitorios (Rollins-Smith, Reinert, O'leary, Houston y Woodhams, 2005).

La enfermedad infecciosa emergente, quitridiomycosis, causada por el patógeno *Batrachochytrium dendrobatidis* está asociada como responsable de declines y extinciones anfibias a nivel mundial. Debido a la necesidad de buscar alternativas para contrarrestar la enfermedad y los resultados obtenidos, podemos sugerir que el presente estudio es un posible tratamiento preventivo para la infección a nivel local.

No obstante, la temperatura ambiental está estrechamente relacionada a los efectos de la quitridiomycosis que son muy diferentes entre poblaciones y especies. Por lo que se sugiere evaluar la idoneidad del clima para el desarrollo de *B. dendrobatidis* y a la vez la susceptibilidad de la especie donde se presenta el patógeno (Fisher et al, 2009). Debido a que los resultados de las múltiples interacciones de relaciones simbióticas en la naturaleza como persistencia, supervivencia o condición física dependen fuertemente del contexto ambiental y ecológico (Daskin y Alford, 2012).

CONCLUSIONES

- Existen bacterias en la piel de los anfibios analizados que inhiben *in vitro* el crecimiento de *Batrachochytrium dendrobatidis*, y en este estudio de cuatro distintas especies de anuros se logró aislar un total de 147 morfotipos bacterianos de la piel, de los cuales 67 morfotipos presentan inhibición.
- El mayor número de morfotipos con inhibición se aislaron de la especie *Pristimantis pyrrhomerus* la cual tiene una categoría de amenaza En Peligro, y también coincide que es la especie que tiene mayor inhibición frente al hongo patógeno.
- Del total de los morfotipos con inhibición el 85.07% son Gram negativos y en todas las especies por separado de igual manera, hay un mayor número de Gram negativos; lo cual se relaciona con la identificación molecular donde obtuvimos que la mayor parte de morfotipos identificados son de género *Pseudomonas*.
- Se comprueba la hipótesis de que la inhibición del hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* varía en función de la especie bacteriana con la cual interactúa, por lo tanto la actividad bacteriana inhibitoria de *Bd* cambia entre especies de anfibios dependiendo de la variable en estudio.

RECOMENDACIONES

- En futuras investigaciones para la conservación de anfibios, sobre todo para programas de manejo de especies *ex situ* (en cautiverio), una medida de prevención a enfermedades infecciosas como la quitridiomycosis podría ser la regulación de la misma mediante microorganismos simbiotes.
- Continuar con futuros estudios de prospección de compuestos antimicrobianos en las mismas u otras especies de ranas. Estos ensayos *in vitro* ayudarían a entender y estudiar la potencial actividad antimicrobiana o sus metabolitos.
- Los análisis de diversidad bacteriana y su variación geográfica-ambiental, así como la elaboración de un protocolo de laboratorio, permitirían implementar estudios de diversidad bacteriana en diferentes organismos con el propósito de conocer las interacciones entre microorganismos beneficiosos y patógenos.
- Se sugiere probar un estudio de las distintas cepas de *Batrachochytrium dendrobatidis* en el mismo hospedero para observar el proceso de la infección.
- Se propone realizar estudios inmunológicos en los cuales se relacione el huésped, el patógeno y el ambiente para cuantificar cuanto puede influir el cambio climático en la respuesta del huésped hacia el patógeno.

BIBLIOGRAFIA

Almendáriz, A., Brito, J., Batallas, D., y Ron, S. (2014). Una especie nueva de rana arbórea del género *Hyloscirtus* (Amphibia: Anura: Hylidae) de la Cordillera del Cóndor. *Papéis Avulsos de Zoologia (São Paulo)*, 54(4), 33-49. Recuperado de <http://www.scielo.br/pdf/paz/v54n4/01.pdf>.

Becker, M. H., Brucker, R. M., Schwantes, C. R., Harris, R. N. y Minbiole K. P. (2009). The Bacterially Produced Metabolite Violacein Is Associated with Survival of Amphibians Infected with a Lethal Fungus. *Appl. Environ. Microbiol.* 75(21), 6635–6638. doi:10.1128/AEM.01294-09.

Becker, M.H. y Harris, R.N. (2010) Cutaneous Bacteria of the Redback Salamander Prevent Morbidity Associated with a Lethal Disease. *PLoS ONE* 5(6): e10957. DOI:10.1371/journal.pone.0010957.

Becker, C. G y Zamudio K. R. (2011). Tropical amphibian populations experience higher disease risk in natural habitats. *PNAS*, 108, 9893–9898 Recuperado de www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1014497108.

Becker, M. H., Harris, R.N. Minibole, K. P., Schwantes, C. R., Rollins-Smith, L.A., Reinert, L. K., ... Gratwicke, B. (2012). Towards a Better Understanding of the Use of Probiotics for Preventing Chytridiomycosis in Panamanian Golden Frogs. *EcoHealth*. 1-6. DOI: 10.1007/s10393-012-0743-0.

Brucker, R. M., Harris, R. N., Schwantes, C. R., Gallaher, T. N., Flaherty, D. C., Lam B. A. y Minbiole, K. P. (2008a). Amphibian Chemical Defense: Antifungal Metabolites of the Microsymbiont *Janthinobacterium lividum* on the Salamander *Plethodon cinereus*. *J Chem Ecol*, 34, 1422–1429. DOI 10.1007/s10886-008-9555-7.

Brucker, R. M., Baylor, C. M., Walters, R. L., Lauer, A., Harris, R. N. y Minbiole, K. P. (2008b). The Identification of 2,4-diacetylphloroglucinol as an Antifungal Metabolite Produced by Cutaneous Bacteria of the Salamander *Plethodon cinereus*. *J Chem Ecol* , 34, 39-43. DOI 10.1007/s10886-007-9352-8.

Carey, C., Bruzgul, J. E., Livo, L. J., Walling, M. L., Kueh, K. A., Dixon, B. F., ... Rogers, K. B. (2006). Experimental Exposures of Boreal Toads (*Bufo boreas*) to a

Pathogenic Chytrid Fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*). *EcoHealth volumen 3* , 5-21. DOI: 10.1007/s10393-005-0006-4.

Coloma, L. A. (2004). *Pristimantis pyrrohomerus*. Recuperado el 23 de Marzo de 2013, de IUCN Red List of Threatened Species: <http://www.iucnredlist.org/details/56892/0>.

Coloma, L. A. (2007). A taxonomic revision of *Atelopus pachydermus*, and description of two new (extinct?) species of *Atelopus* from Ecuador (Anura: Bufonidae). *ZOOTAXA* , 1.

Coloma, L. A. (2010). *Hyloxalus delatorreae*. Recuperado el 20 de Marzo de 2013, de AmphibiaWebEcuador: <http://zoologia.puce.edu.ec/vertebrados/anfibios/FichaEspecie.aspx?Id=1230>

Coloma, L. A., Ortiz, D. A. y Frenkel, C. 2013. *Hyloxalus delatorreae*. En: Ron, S. R., Guayasamin, J. M., Yanez-Muñoz, M. H., Merino-Viteri, A. y Ortiz, D. A. AmphibiaWebEcuador. Version 2014.0. Recuperado de la página del Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. <<http://zoologia.puce.edu.ec/vertebrados/anfibios/FichaEspecie.aspx?Id=1230>>

Daskin, J. H. y Alford, R. A. (2012). Context-dependent symbioses and their potential roles in wildlife diseases. *Proceedings of the Royal Society*, 279,1457–1465. DOI: 10.1098/rspb.2011.2276.

Duellman, W.E. y Hillis, D.M. (1990). Systematics of frogs of the *Hyla larinopygion* group. *Occasional Papers of the Museum of Natural History*, The University of Kansas, (134):1-23.

Ezziyyani, M. S. Ahmed, A. S., Pérez, C., Requena, M. E. y Candela M. E. (2006). Control Biológico por Microorganismos Antagonistas. *Tecnología de Producción*, 191. 8-15. Recuperado de http://www.horticom.com/revistasonline/horticultura/rh191/08_15.pdf.

Fisher, M. C., Garner, T. y Walker, S. F. (2009). Global Emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and Amphibian Chytridiomycosis in Space, Time, and Host. *Annu. Rev. Microbiol*, 63, 291-310. DOI: 10.1146/annurev.micro.091208.073435.

Flechas, S. V., Sarmiento, C., Cárdenas, M. E., Medina, E. M., Restrepo, S. y Amézquita, A. (2012). Surviving Chytridiomycosis: Differential Anti-*Batrachochytrium dendrobatidis* Activity in Bacterial Isolates from Three Lowland Species of *Atelopus*. *Plos One*, volumen 7, e44832. DOI:10.1371/journal.pone.0044832.

Flechas V. (2012). Protocolo de aislamiento bacteriano de la piel de anuros y pruebas de antagonismo. Universidad de los Andes de Bogotá. Bogotá - Colombia.

Ghirardi, R., López, J. A., Levy, M. G., Corbalán, V., Steciow, M. M. y Perotti, M. G. (2011). First record of the chytrid fungus in *Lithobates catesbeianus* from Argentina: exotics species and conservation. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 82,1337-1339. Recuperado de <http://scielo.unam.mx/pdf/rmbiodiv/v82n4/v82n4a29.pdf>.

Harris, R. N., James, T. Y., Lauer, A., Simon, M. A. y Patel, A. (2006). Amphibian Pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* is Inhibited by the Cutaneous Bacteria of Amphibian Species. *EcoHealth*, 3, 53-56. DOI: 10.1007/s10393-005-0009-1.

Harris, R. N., Brucker, R. M., Walke, J. B., Becker, M. H., Schwantes, C. R., Flaherty, D. C., ... Minbiole, K. (2009a). Skin microbes on frogs prevent morbidity and mortality caused by a lethal skin fungus. *International Society for Microbial Ecology*, 3, 818-824. DOI:10.1038/ismej.2009.27.

Harris, R. N., Lauer, A., Simon, M. A., Banning, J. L. y Alford, R.A. (2009b). Addition of antifungal skin bacteria to salamanders ameliorates the effects of chytridiomycosis. *Dis Aquat Org*, 83, 11-16. DOI: 10.3354/dao02004

Hernández Gaón, S. (2012) Estructura y Estado de Conservación de las Ranas *Pristimantis* (Anura: Craugastoridae) en el Bosque Protector Mirador de las Golondrinas. Provincia del Carchi, Ecuador. (Tesis inédita de pregrado) Universidad Central del Ecuador.

James, T. Y., Litvintseva, A. P., Vilgalys, R., Morgan, J. A., Taylor, J. W., ... Logcore, J. E. (2009). Rapid Global Expansion of the Fungal Disease Chytridiomycosis into Declining and Healthy Amphibian Populations. *PLoS Pathogens*, 5, e1000458. DOI:10.1371/journal.ppat.1000458

Kilpatrick, A. M., Briggs, C. J. y Daszak, P. (2009). The ecology and impact of chytridiomycosis: an emerging disease of amphibians. *Trends in Ecology and Evolution*. 3, 1-10. DOI:10.1016/j.tree.2009.07.011.

Kim, S. H., Jeong, H. S., Kim, Y. H., Song, S. A., Lee, J. Y., Oh, S. H., ... Shin, J. H. (2012). Evaluation of DNA Extraction Methods and Their Clinical Application for Direct Detection of Causative Bacteria in Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis Culture Fluids from Patients with Peritonitis by Using Broad-Range PCR. *Ann Lab Med*; 32, 119-125. Recuperado de <http://dx.doi.org/10.3343/alm.2012.32.2.119>

Kusrini, M. D., Skerratt, L. F., Garland, S., Berger, L. y Endarwin, W. (2008). Chytridiomycosis in Frogs of Mount Gede Pangrango, Indonesia. *Disq Acuut Organ*. 82(3) 187-194. DOI: 10.3354/dao01981

Lam, B. A., Walke, J. B., Vredenburg, V. T. y Harris, R. N. (2010). Proportion of individuals with anti-*Batrachochytrium dendrobatidis* skin bacteria is associated with population persistence in the frog *Rana muscosa*. *Biological Conservation*, 143, 530-531. DOI:10.1016/j.biocon.2009.11.015.

Lauer, A., Simon, M. A., Banning, J. L., Lam, B. A. y Harris, R. N. (2008). Diversity of cutaneous bacteria with antifungal activity isolated from female four-toed salamanders. *The ISME Journal*, 2, 145-157. DOI:10.1038/ismej.2007.110.

Lips, K. R., Diffendorfer, J., Mendelson III, J. R. y Sears, M.W. (2008). Riding the Wave: Reconciling The roles of Disease and Climate Change in Amphibian Declines. *PLoS Biology*, 6, 448-453. DOI: 10.1371/journal.pbio.0060072

Lips, K. R. (1998). Decline of a tropical montane amphibian fauna. *Conservation Biology*, 113-114.

Longcore, J. E., Pessier, A. P, y Nichols, D. K. (1999). *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycology* 91 , 219-227.

Martel, A., Rooij, P. V., Vercauteren, G., Baert. K., Waeyenberghe, L. V, Debacker, P., ... Pasmans, F. (2010). Developing a safe antifungal treatment protocol to eliminate

Batrachochytrium dendrobatidis from amphibians. *Medical Mycology* 1-7. DOI: 10.3109/13693786.2010.508185

McCracken, S., Gaertner, J. P., Forstner, M. R., y Hahn, D. (2009). Detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Amphibians from the Forest Floor to the Upper Canopy of an Ecuadorian Amazon Lowland Rainforest. *Herpetological Review*, 40(2), 190-195. DOI: 10.3109/13693786.2010.508185.

McKenzie, V. J., Bowers, R. M., Fierer, N., Knight, R. y Lauber, C. L. (2011). Co-habiting amphibian species harbor unique skin bacterial communities in wild populations. *The ISME Journal*, 6(3), 588–596. DOI: 10.1038/ismej.2011.129.

Melzer, S y Bishop, P. J. (2009). Skin peptide defenses of New Zealand frogs against chytridiomycosis. *Animal Conservation*, 13, 44-52. DOI: 10.1111/j.1469-1795.2009.00340.x

Menéndez, P. A. y Graham, C. H. (2013). Evaluating multiple causes of amphibian declines of Ecuador using geographical quantitative analyses. *Ecography*, 36, 001-014 DOI: 10.1111/j.1600-0587.2012.07877.x

Organización de los Estados Iberoamericanos. (S. F.). *Divulgación y Cultura Científica Iberoamericana*. Recuperado el 8 de Febrero de 2013, de Al Rescate de los Sapos Parteros. Recuperado de http://www.oei.es/divulgacioncientifica/reportajes_453.htm

Ortiz, D. A., Coloma, L. A., Frenkel, C., Ron, S. R. y Quiguango-Ubillús, A. (2013). *Hyloscirtus larinopygion*. En: Ron, S. R., Guayasamin, J. M., Yanez-Muñoz, M. H., Merino-Viteri, A. y Ortiz, D. A. *AmphibiaWebEcuador*. Version 2014.0. Recuperado de la página del Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador <<http://zoologia.puce.edu.ec/vertebrados/anfibios/FichaEspecie.aspx?Id=1304>>, acceso febrero 19, 2014

Piotrowski J. S., Annis S. L. y Longcore J. E. (2004). Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. *Mycologia* 96, 9–15. Recuperado de <http://www.mycologia.org/content/96/1/9.full.pdf+html>

- Rollins-Smith, L.A., Reinert, L. K., O’leary, C. J., Houston, L.E y Woodhams, D.C. (2005). Antimicrobial Peptide Defenses in Amphibian Skin. *Integr. Comp. Biol.* 45. 137–142. DOI: 10.1093/icb/45.1.137.
- Rollins-Smith, L. A., Ramsey, J. P., Pask, J. D., Reinert, L. K., Woodhams, D. C. (2011). Symposium-Amphibian Immune Defenses against Chytridiomycosis: Impacts of Changing Environments. *Integrative and Comparative Biology.* 1-11. DOI: 10.1093/icb/icr095
- Ron, R. N., Duellman, W. E., Coloma, L.A. y Bustamante, M. R. (2003). Population Decline of the Jambato Toad *Atelopus ignescens* (Anura: Bufonidae) in the Andes of Ecuador. *Journal of Herpetology*, 37, 116-126. Recuperado de <http://www.jstor.org/stable/1565838>
- Ron, S. R., Guayasamin, J. M., Yanez-Muñoz, M. H., Merino-Viteri, A. y Ortiz, D. A. 2014. AmphibiaWebEcuador. Version 2014.0. Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. < <http://zoologia.puce.edu.ec/Vertebrados/anfibios/AnfibiosEcuador>>
- Rosenblum, E. B., Voyles, J., Poorten, T. J., Stajich, J. E. (2010). The Deadly Chytrid Fungus: A Story of an Emerging Pathogen. *Plos Pathogs*, 6,(1). DOI: 10.1371/journal.ppat.1000550
- Ruiz, A. y Rueda, J. V. (2008). *Batrachochytrium dendrobatidis* and Chytridiomycosis in Anuran Amphibians of Colombia. *EcoHealth*, 5 , 27-33. DOI: 10.1007/s10393-008-0159-z
- Seeley, H. W., Vandemark, P. J. (1981). *Microbes in Action: A Laboratory Manual of Microbiology.*
- Tobler, U. y Schmidt, B. R. (2010). Within- and Among-Population Variation in Chytridiomycosis-Induced Mortality in the Toad *Alytes obstetricans*. *Plos One*, 5 (6), 1-9. DOI: 10.1371/journal.pone.0010927.
- Voyles, J. Rosenblum, E. B. y Berger, L. (2011). Interactions between *Batrachochytrium dendrobatidis* and its amphibian hosts: a review of pathogenesis and immunity. *Microbes and Infection*, 13, 25-32. DOI:10.1016/j.micinf.2010.09.015.

Voyles, J., Sam, Y., Berger, L., Campbell, C., Voyles, W. F., Dinudom, A., ... Speare, R. (2009). Pathogenesis of Chytridiomycosis, a Cause of Catastrophic Amphibian Declines. *Science*, 326, 582-585. DOI: 10.1126/science.1176765.

Woodhams, D. C., Vredenburg, V. T., Simon, M.-A., Billheimer, D., Shakhtou, B., Shyr, Y., ... Harris, R. N. (2007). Symbiotic bacteria contribute to innate immune defenses of the threatened mountain yellow-legged frog, *Rana muscosa*. *Biological Conservation*, 138, 390-398. DOI: 10.1016/j.biocon.2007.05.004.

Yáñez, M. H., Meza, P., Altamirano, M. y Castro, C. (2010). Estado poblacional de una de rana nodriza (Anura: Dendrobatidae: *Hyloxalus delatorreae*), críticamente amenazada, en los Andes Norte de Ecuador. *Boletín Técnico*, 9, 39-49.

ANEXOS

Anexo 1. Fórmula de solución DS y medio de cultivo R2A.

PREPARACION DE LA SOLUCION DS.

Esta solución se constituye de sales débiles que simula agua de charca constituida de

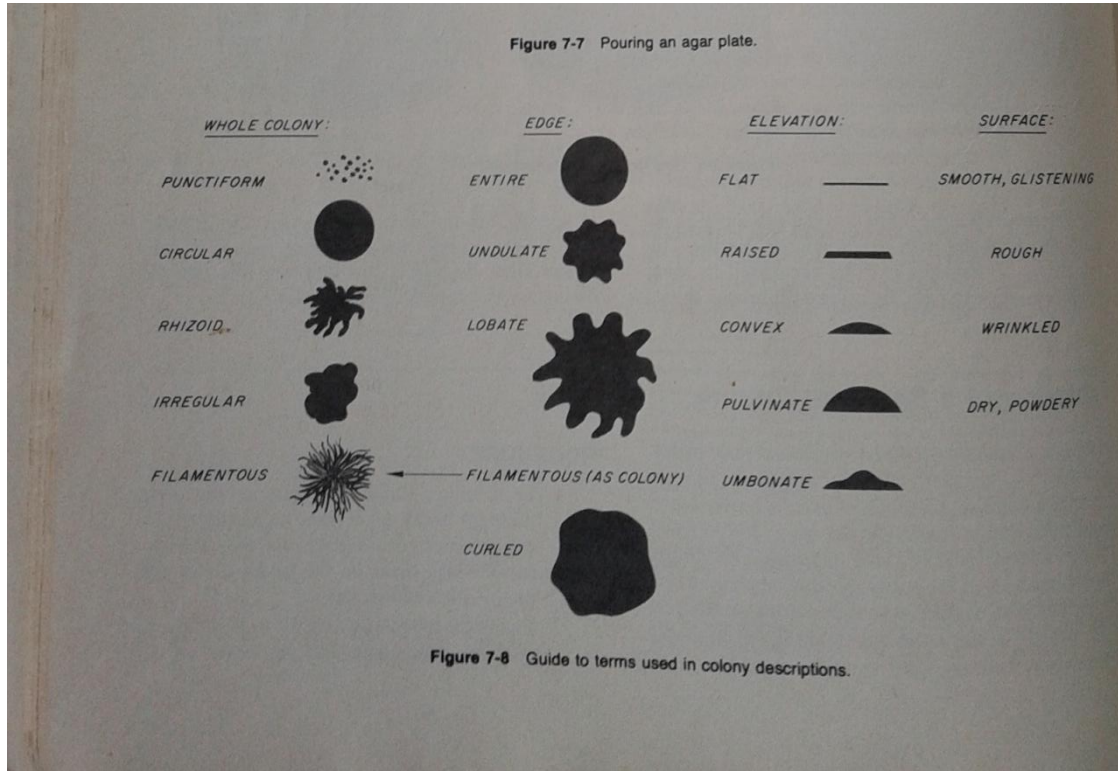
- KH_2PO_4 al 10^{-3}M
- MgCl_2 al 10^{-4}M
- CaCl_2 al $2 \times 10^{-5}\text{M}$

PREPARACION DE MEDIO R2A.

Para un 1L de medio (aproximadamente 35-40 cajas de petri) mezclar los siguientes reactivos. En el paréntesis está el código del reactivo

- 0.5 g Extracto de levadura (C10)
- 0.5 g Protease peptone No. 3 (C21/C18)
- 0.5 g Casamino acids (C28)
- 0.5 g Dextrosa (AZ14)
- 0.5 g Soluble Starch (C4)
- 0.3 g Sodium Pyruvate (Gecoh)
- 0.3 g Dipotassium phosphate (Gecoh)
- 0.05 g Magnesium Sulfate (R57)
- 15.0 g Agar (C3).

Anexo 2. Descripción Colonial del libro “Microbes in Action: A Laboratory Manual of Microbiology”, Seeley y Vandemark, 1981



Anexo 3. Descripción de características morfológicas de los morfotipos bacterianos aislados.

CÓDIGO	FORMA	BORDE	ELEVACIÓN	SUPERFICIE	COLOR	TAMAÑO
PA1-01	Irregular	Entero	Convexo	Seca, polvosa	Blanco/Transparente	Pequeña
PA1-02	Irregular	Ondulado	Convexo	Liso,brillante	Blanca	Mediana
PA1-03	Irregular	Entero	Elevada	Liso,brillante	Crema	Grande
PA1-04	Irregular	Ondulado	Convexo	Liso,brillante	Crema	Grande
PA1-05	Circular	Entero	Elevada	Liso,brillante	Blanca	Mediana
PA1-06	Circular	Entero	Elevada	Liso,brillante	Crema	Pequeña
PA1-07	Circular	Entero	Elevada	Liso,brillante	Crema	Pequeña
PA1-08	Circular	Entero	Elevada	Liso,brillante	Crema	Mediana
PA1-10	Circular	Entero	Elevada	Liso,brillante	Crema	Mediana
PA2-01	Puntiforme	Entero	Convexo	Áspera	Blanca	Pequeña
PA2-02	Irregular	Ondulado	Elevada	Liso,brillante	Blanca	Grande
PA2-03	Circular	Entero	Convexo	Liso,brillante	Blanca	Mediana
PA2-04	Irregular	Entero	Elevada	Liso,brillante	Amarilla	Mediana
PA2-05	Circular	Entero	Elevada	Liso,brillante	Crema	Pequeña
PA2-06	Puntiforme	Entero	Elevada	Liso,brillante	Crema	Grande
PA2-07	Irregular	Ondulado	Elevada	Liso,brillante	Crema	Grande
PA2-08	Irregular	Entero	Elevada	Liso,brillante	Crema	Pequeña
PA2-09	Irregular	Ondulado	Elevada	Liso,brillante	Blanca	Mediana
PA2-10	Irregular	Ondulado	Plana	Liso,brillante	Blanco/Transparente	Medianas y grandes
PA2-11	Irregular	Entero	Plana	Liso,brillante	Transparente	Pequeña
PA2-12	Irregular	Entero	Plana	Liso,brillante	Transparente	Mediana
PA2-13	Irregular	Ondulado	Elevada	Liso,brillante	Blanca	Grande
PA2-14	Circular	Entero	Elevada	Liso,brillante	Crema	Pequeña
PA2-15	Circular	Entero	Elevada	Liso,brillante	Crema	Pequeña
PA2-16	Irregular	Entero	Elevada	Liso,brillante	Crema	Pequeña
PA2-17	Irregular	Ondulado	Elevada	Liso,brillante	Crema	Pequeña
PA2-18	Irregular	Ondulado	Elevada	Liso,brillante	Crema	Mediana
PA2-19	Irregular	Ondulado	Plana	Liso,brillante	Transparente	Mediana
PA2-20	Circular	Entero	Elevada	Liso,brillante	Crema	Pequeña
PA2-21	Circular	Entero	Elevada	Liso,brillante	Crema	Pequeña
PA2-22	Circular	Entero	Convexo	Liso,brillante	Crema	Pequeña
PB1-01	Circular	Entero	Convexo	Liso,brillante	Crema	Pequeña
PB1-02	Irregular	Ondulado	Plana	Liso,brillante	Blanco/Transparente	Mediana
PB1-03	Irregular	Entero	Elevada	Áspera	Blanca	Pequeña
PB1-04	Irregular	Ondulado	Elevada	Áspera	Blanco/Transparente	Mediana

PB1-05	Irregular	Ondulado	Plana	Liso,brillante	Blanco/Transparente	Mediana
PB1-06	Irregular	Ondulado	Elevada	Liso,brillante	Blanco/Transparente	Mediana
PB1-07	Irregular	Entero	Plana	Liso,brillante	Blanco/Transparente	Grande
PB1-08	Irregular	Entero	Elevada	Liso,brillante	Blanco/Transparente	Pequeña
PB1-09	Irregular	Ondulado	Elevada	Áspera	Blanco/Transparente	Mediana
PB1-10.1	Circular	Entero	Elevada	Liso,brillante	Crema	Pequeña
PB1-10.2	Irregular	Ondulado	Plana	Liso,brillante	Blanco/Transparente	Mediana
PB1-11	Circular	Entero	Elevada	Liso,brillante	Crema	Pequeña
PB1.12.1	Circular	Entero	Elevada	Liso,brillante	Crema	Pequeña
PB1-12.2	Irregular	Ondulado	Plana	Liso,brillante	Blanco/Transparente	Mediana
PB1-13	Circular	Entero	Elevada	Liso,brillante	Tomate	Mediana
PB1-14	Circular	Entero	Elevada	Liso,brillante	Crema	Pequeña
PB1-15	Circular	Entero	Elevada	Liso,brillante	Crema	Pequeña
PB1-16	Circular	Entero	Convexo	Liso,brillante	Tomate	Mediana
PB2-01	Irregular	Entero	Elevada	Liso,brillante	Crema	Pequeña
PB2-02	Circular	Entero	Elevada	Liso,brillante	Amarilla	Pequeña
PB2-03	Circular	Entero	Elevada	Liso,brillante	Crema	Pequeña
PB2-04	Circular	Entero	Elevada	Liso,brillante	Blanca	Pequeña
PB2-05	Irregular	Entero	Elevada	Liso,brillante	Crema	Pequeña
PB2-06	Irregular	Ondulado	Elevada	Áspera	Blanca	Mediana
PB3-01	Irregular	Ondulado	Elevada	Áspera	Crema	Mediana
PB3-02	Circular	Entero	Elevada	Liso,brillante	Crema	Pequeña
PB3-03	Irregular	Entero	Elevada	Liso,brillante	Crema	Mediana
PB3-04	Circular	Entero	Elevada	Liso,brillante	Crema	Pequeña
PB3-05	Irregular	Entero	Elevada	Áspera	Crema	Pequeña
PB3-06	Irregular	Ondulado	Plana	Áspera	Crema	Mediana
PB4-01	Irregular	Entero	Elevada	Liso,brillante	Crema	Mediana
PB4-02	Irregular	Ondulado	Plana	Liso,brillante	Blanco/Transparente	Mediana
PB4-03	Circular	Entero	Convexo	Liso,brillante	Tomate	Pequeña
PB4-04	Circular	Entero	Convexo	Liso,brillante	Crema	Mediana
PB4-05	Circular	Entero	Convexo	Liso,brillante	Crema	Grande
PB4-06	Irregular	Lobulado	Elevada	Liso,brillante	Crema	Mediana
PB4-07	Irregular	Ondulado	Plana	Liso,brillante	Crema	Pequeña
PB4-08	Circular	Entero	Elevada	Liso,brillante	Blanca	Mediana
PB4-09	Circular	Entero	Elevada	Liso,brillante	Crema	Mediana
PB4-10	Circular	Entero	Elevada	Liso,brillante	Crema	Grande

PB4-12	Irregular	Entero	Elevada	Liso,brillante	Blanco/Transparente	Mediana
PB4-13	Irregular	Entero	Elevada	Liso,brillante	Crema	Pequeña
PB4-14	Irregular	Rizado	Elevada	Liso,brillante	Blanco/Transparente	Mediana
PB5-01	Irregular	Entero	Elevada	Liso,brillante	Blanca	Grande
PB5-02	Circular	Entero	Elevada	Liso,brillante	Crema	Pequeña
PB5-03	Circular	Entero	Convexo	Liso,brillante	Crema	Pequeña
PB5-07	Irregular	Lobulado	Plana	Liso,brillante	Blanca	Pequeña
PB5-08	Irregular	Entero	Elevada	Liso,brillante	Crema	Medianas y pequeñas
PB5-09	Irregular	Entero	Elevada	Liso,brillante	Crema	Pequeña
PB5-10	Irregular	Entero	Elevada	Liso,brillante	Crema	Pequeña
PB5-11	Irregular	Ondulado	Plana	Liso,brillante	Amarilla	Mediana
PB5-12	Irregular	Entero	Convexo	Liso,brillante	Tomate	Grande
PB5-13	Irregular	Entero	Elevada	Liso,brillante	Tomate	Grande
PB5-14	Irregular	Lobulado	Elevada	Liso,brillante	Blanca	Mediana
PB5-15	Circular	Entero	Convexo	Liso,brillante	Crema	Pequeña
PB5-16a	Irregular	Entero	Elevada	Liso,brillante	Blanco/Transparente	Mediana
PB5-16b	Irregular	Entero	Elevada	Liso,brillante	Tomate	Medianas y grandes
PB5-17	Irregular	Ondulado	Elevada	Liso,brillante	Blanco/Transparente	Grande
PB5-18	Irregular	Ondulado	Plana	Liso,brillante	Blanca	Mediana
PC1-01	Irregular	Entero	Plana	Liso,brillante	Blanco/Transparente	Mediana
PC1-02	Irregular	Entero	Elevada	Liso,brillante	Crema	Mediana
PC1-03	Irregular	Entero	Elevada	Liso,brillante	Blanca	Medianas y grandes
PC1-04	Circular	Entero	Convexo	Liso,brillante	Crema	Pequeña
PC1-05	Irregular	Entero	Elevada	Liso,brillante	Blanca	Grande
PC1-06	Irregular	Ondulado	Plana	Liso,brillante	Blanca	Grande
PC1-07	Circular	Entero	Convexo	Liso,brillante	Tomate	Pequeña
PC1-08	Irregular	Entero	Plana	Liso,brillante	Blanco/Transparente	Mediana
PC1-09	Irregular	Entero	Plana	Liso,brillante	Blanco/Transparente	Mediana
PC2-01	Irregular	Lobulado	Plana	Liso,brillante	Blanca	Mediana
PC2-02	Irregular	Entero	Elevada	Liso,brillante	Crema	Mediana
PC2-03	Irregular	Ondulado	Elevada	Liso,brillante	Crema	Mediana
PC2-04	Circular	Entero	Convexo	Liso,brillante	Rosada	Grande
PC2-05	Irregular	Lobulado	Elevada	Liso,brillante	Crema	Grande
PC2-06	Irregular	Entero	Elevada	Liso,brillante	Crema	Grande
PC2-07	Irregular	Lobulado	Elevada	Liso,brillante	Crema	Grande

PD1-01	Irregular	Entero	Plana	Liso,brillante	Blanca	Mediana
PD1-02	Irregular	Entero	Elevada	Liso,brillante	Crema	Grande
PD1-03	Irregular	Ondulado	Plana	Liso,brillante	Blanca	Mediana
PD1-05	Irregular	Entero	Convexo	Liso,brillante	Crema	Grande
PD1-06	Irregular	Ondulado	Convexo	Liso,brillante	Blanca	Mediana
PD1-07	Irregular	Entero	Plana	Liso,brillante	Blanca	Mediana
PD1-08	Irregular	Entero	Convexo	Liso,brillante	Crema	Mediana
PD1-09	Irregular	Entero	Plana	Liso,brillante	Blanco/Transparente	Grande
PD2-01	Irregular	Entero	Convexo	Liso,brillante	Crema	Mediana
PD2-02	Circular	Entero	Convexo	Liso,brillante	Tomate	Mediana
PD2-03	Irregular	Entero	Convexo	Liso,brillante	Crema	Pequeña
PD2-04	Irregular	Entero	Convexo	Liso,brillante	Blanca	Grande
PD2-05	Irregular	Entero	Plana	Liso,brillante	Crema	Grande
PD2-06	Irregular	Entero	Convexo	Liso,brillante	Crema	Grande
PD2-07	Circular	Entero	Elevada	Liso,brillante	Crema	Pequeña
PD2-08	Circular	Entero	Convexo	Liso,brillante	Blanca	Grande
PD2-09	Circular	Entero	Convexo	Liso,brillante	Crema	Pequeña
PD2-10	Irregular	Entero	Plana	Liso,brillante	Blanco/Transparente	Pequeña
PD2-11	Irregular	Entero	Convexo	Liso,brillante	Blanco/Transparente	Grande
PD2-12	Irregular	Entero	Plana	Liso,brillante	Blanca	Grande
PD2-13	Irregular	Entero	Plana	Liso,brillante	Blanca	Grande
PD2-14	Circular	Entero	Convexo	Liso,brillante	Amarilla	Pequeña
PD2-15	Irregular	Entero	Plana	Liso,brillante	Blanco/Transparente	Grande
PD2-16	Irregular	Entero	Convexo	Liso,brillante	Blanco/Transparente	Grande
PD2-17	Circular	Entero	Convexo	Liso,brillante	Crema	Grande
PD2-18	Circular	Entero	Plana	Liso,brillante	Crema	Grande
PD2-19	Irregular	Entero	Convexo	Liso,brillante	Crema	Mediana
PD2-20	Irregular	Entero	Plana	Liso,brillante	Crema	Mediana
PD2-21	Circular	Entero	Convexo	Liso,brillante	Tomate	Pequeña
PD2-22	Circular	Entero	Convexo	Liso,brillante	Rosada	Mediana
PD3-01	Irregular	Entero	Plana	Liso,brillante	Blanco/Transparente	Mediana
PD3-02	Irregular	Entero	Plana	Liso,brillante	Blanca	Mediana
PD3-03	Irregular	Entero	Plana	Liso,brillante	Blanco/Transparente	Grande
PD3-04	Irregular	Entero	Plana	Liso,brillante	Crema	Mediana
PD3-05	Circular	Entero	Convexo	Liso,brillante	Crema	Mediana
PD3-06	Circular	Entero	Elevada	Liso,brillante	Tomate	Mediana

PD3-07	Circular	Entero	Convexo	Liso,brillante	Crema	Mediana
PD3-08	Circular	Entero	Convexo	Liso,brillante	Crema	Pequeña
PD3-09	Irregular	Entero	Plana	Liso,brillante	Blanco/Transparente	Grande
PD3-10	Circular	Entero	Elevada	Liso,brillante	Crema	Pequeña
PD3-11	Irregular	Entero	Plana	Liso,brillante	Blanco/Transparente	Grande

Anexo 4. Descripción microscópica de los morfotipos con inhibición

ESPECIE	COD LAB	GRAM
<i>Hyloscirtus larinopygion</i>	PA1-4	bacilos Gram (-)
<i>Hyloscirtus larinopygion</i>	PA1-1	bacilos Gram (-)
<i>Hyloscirtus larinopygion</i>	PA2-6	bacilos Gram (-)
<i>Hyloscirtus larinopygion</i>	PA2-2	bacilos Gram (+)
<i>Hyloscirtus larinopygion</i>	PA2-7	bacilos Gram (-)
<i>Hyloscirtus larinopygion</i>	PA2-11	bacilos Gram (-)
<i>Hyloscirtus larinopygion</i>	PA2-12	bacilos Gram (+)
<i>Hyloscirtus larinopygion</i>	PA2-18	bacilos Gram (+)
<i>Hyloscirtus larinopygion</i>	PA2-22	bacilos Gram (-)
<i>Hyloxalus dalatorreae</i>	PB1-2	bacilos Gram (+)
<i>Hyloxalus dalatorreae</i>	PB1-7	bacilos Gram (-)
<i>Hyloxalus dalatorreae</i>	PB1-8	bacilos Gram (-)
<i>Hyloxalus dalatorreae</i>	PB1-9	bacilos Gram (+)
<i>Hyloxalus dalatorreae</i>	PB1-10 colonia2	bacilos Gram (-)
<i>Hyloxalus dalatorreae</i>	PB1-12 colonia 2	bacilos Gram (-)
<i>Hyloxalus dalatorreae</i>	PB3-1	bacilos Gram (-)
<i>Hyloxalus dalatorreae</i>	PB3-6	bacilos Gram (-)
<i>Hyloxalus dalatorreae</i>	PB4-2	bacilos Gram (-)
<i>Hyloxalus dalatorreae</i>	PB4-6	bacilos Gram (-)
<i>Hyloxalus dalatorreae</i>	PB4-7	bacilos Gram (-)
<i>Hyloxalus dalatorreae</i>	PB4-8	bacilos Gram (-)
<i>Hyloxalus dalatorreae</i>	PB4-12	bacilos Gram (-)
<i>Hyloxalus dalatorreae</i>	PB4-14	bacilos Gram (-)
<i>Hyloxalus dalatorreae</i>	PB5-1	bacilos Gram (-)
<i>Hyloxalus dalatorreae</i>	PB5-7	bacilos Gram (-)
<i>Hyloxalus dalatorreae</i>	PB5-9	bacilos Gram (-)
<i>Hyloxalus dalatorreae</i>	PB5-14	bacilos Gram (-)
<i>Hyloxalus dalatorreae</i>	PB5-17	bacilos Gram (-)
<i>Hyloxalus dalatorreae</i>	PB5-18	bacilos Gram (-)
<i>Pristimantis sp.</i>	PC1-1	bacilos Gram (-)
<i>Pristimantis sp.</i>	PC1-2	bacilos Gram (-)
<i>Pristimantis sp.</i>	PC1-3	bacilos Gram (-)
<i>Pristimantis sp.</i>	PC1-5	bacilos Gram (-)
<i>Pristimantis sp.</i>	PC1-6	bacilos Gram (-)
<i>Pristimantis sp.</i>	PC1-8	bacilos Gram (-)
<i>Pristimantis sp.</i>	PC1-9	bacilos Gram (-)
<i>Pristimantis sp.</i>	PC2-1	bacilos Gram (-)
<i>Pristimantis sp.</i>	PC2-2	bacilos Gram (-)
<i>Pristimantis sp.</i>	PC2-3	bacilos Gram (-)
<i>Pristimantis sp.</i>	PC2-5	bacilos Gram (+)

<i>Pristimantis sp.</i>	PC2-6	bacilos Gram (-)
<i>Pristimantis sp.</i>	PC2-7	bacilos Gram (-)
<i>Pristimantis pyrrhomerus</i>	PD1-1	bacilos Gram (-)
<i>Pristimantis pyrrhomerus</i>	PD1-2	bacilos Gram (-)
<i>Pristimantis pyrrhomerus</i>	PD1-3	bacilos Gram (-)
<i>Pristimantis pyrrhomerus</i>	PD1-5	bacilos Gram (+)
<i>Pristimantis pyrrhomerus</i>	PD1-6	bacilos Gram (+)
<i>Pristimantis pyrrhomerus</i>	PD1-7	bacilos Gram (-)
<i>Pristimantis pyrrhomerus</i>	PD1-9	bacilos Gram (-)
<i>Pristimantis pyrrhomerus</i>	PD2-4	bacilos Gram (-)
<i>Pristimantis pyrrhomerus</i>	PD2-5	bacilos Gram (-)
<i>Pristimantis pyrrhomerus</i>	PD2-7	bacilos Gram (-)
<i>Pristimantis pyrrhomerus</i>	PD2-8	bacilos Gram (-)
<i>Pristimantis pyrrhomerus</i>	PD2-9	bacilos Gram (-)
<i>Pristimantis pyrrhomerus</i>	PD2-10	bacilos Gram (+)
<i>Pristimantis pyrrhomerus</i>	PD2-11	bacilos Gram (-)
<i>Pristimantis pyrrhomerus</i>	PD2-12	bacilos Gram (-)
<i>Pristimantis pyrrhomerus</i>	PD2-15	bacilos Gram (-)
<i>Pristimantis pyrrhomerus</i>	PD2-16	bacilos Gram (+)
<i>Pristimantis pyrrhomerus</i>	PD2-17	bacilos Gram (-)
<i>Pristimantis pyrrhomerus</i>	PD2-18	bacilos Gram (-)
<i>Pristimantis pyrrhomerus</i>	PD3-1	bacilos Gram (-)
<i>Pristimantis pyrrhomerus</i>	PD3-2	bacilos Gram (-)
<i>Pristimantis pyrrhomerus</i>	PD3-3	bacilos Gram (-)
<i>Pristimantis pyrrhomerus</i>	PD3-5	bacilos Gram (-)
<i>Pristimantis pyrrhomerus</i>	PD3-9	bacilos Gram (-)
<i>Pristimantis pyrrhomerus</i>	PD3-11	bacilos Gram (-)

Anexo 5. Protocolo para medir el halo de inhibición *Bd* sugerido por la Lcda. Ailin Blasco.

a. Instalar Image-J

Image-J instalar el programa desde:

<http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>

Bajar el plugin chart White_balance:

http://imagejdocu.tudor.lu/doku.php?id=plugin:color:chart_white_balance:start

Esto chart_white_balance.zip descomprimido colocarlo dentro de la carpeta del Image-J en su computadora dentro de la subcarpeta de plugins.

b. Editar fotos. Utilizando Adobe Photoshop u otro programa como vista previa que permitan girar las imágenes. Girar todas las fotografías de tal forma que la regla quede del lado izquierdo. Guardar al documento como archivo JPEG.

c. Medir

I. Abrir una foto a través de Image-J.

II. Escoger la herramienta de línea simple (Straight) para trazar una línea en la foto desde el BLANCO hasta el negro (sobre referencia de hoja de colores de la foto, línea amarilla), como en el ejemplo:

III. Ir a Plugins y hacer click en Macros, luego click en RUN.

IV. Buscar la carpeta de aplicaciones de Image-J, en la carpeta Plugins escoger el chart White_Balance.txt que bajaron anteriormente.

V. Una vez que dan click en el paso anterior, esperar que la imagen sea procesada. Aparece una ventana nueva en donde deben poner ok. La foto cambiará en tonalidad y contraste.

VI. Después para calibrar la escala, con la misma herramienta, medir 1cm en la regla de la foto. Hacer click en la barra en Analyse.

Escoger Set Scale, en la ventana que se despliega reemplazar:

know distance por 1; y en unith for length poner: cm. Click en OK.

VII. Para medir el área del halo, escoger la herramienta “rectangular”. Se hace un rectángulo que tenga de alto 3cm y se mide desde la bacteria de prueba, hacia la de control negativo (*E. coli*).

VIII. Después cuando ya se tiene la selección, hacer click en Plot Profile. Se genera una lista de datos que se la guarda como .txt con el nombre de la foto que se está midiendo.

IX. Se necesita otra medida que es el valor m de gris y ese se saca haciendo click en analyze y luego Measure que genera una ventana con un valor min y un max. Se lo guarda como documento .txt con el nombre de la foto medida + la palabra GRIS.

Anexo 6. Protocolo de extracción de ADN bacteriano por el método de calentamiento, Kim et al. (2012) con modificaciones establecidas para el CICBA.

1. Verificar un buen crecimiento bacteriano en la caja de Petri.
2. Tomar el crecimiento bacteriano con un hisopo y colocar en un tubo eppendorf de 1.5 ml que contiene 1 ml de agua milli-Q.
3. Colocar en el vortex varios segundos para homogenizar la solución.
4. Color el tubo eppendorf en el termobloque a una temperatura de 90°C aproximadamente por 15 minutos.
5. Colocar en la centrífuga a 13000rpm y tomar el sobrenadante en un tubo eppendorf nuevo.

Anexo 7. Concentración de ADN enviado a Macrogen Inc. (Seúl-Corea).

Morfotipo	Concentración de ADN (ng/uL)	260/280
PA1-2	44.9	1.9
PA1-4	62.1	1.85
PA1-5	123.2	1.87
PA2-10	40.2	2
PA2-11	48.2	1.98
PA2-12	45.3	1.87
PA2-18	72.4	1.97
PA2-19	56.2	1.96
PA2-2	140.8	1.88
PA2-22	135.55	1.89
PA2-6	39	1.98
PA2-7	17.8	1.9
PB1-10(2)	40.4	1.82
PB1-12(2)	36	1.85
PB1-2	58.4	1.82
PB1-7	175.88	1.98
PB1-8	50.9	1.86
PB1-9	181.36	2.03
PB3-1	32.9	1.93
PB3-6	212.29	2.01
PB4-12	223.43	1.81
PB4-14	20.7	1.8
PB4-2	28	1.95
PB4-6	23	1.86
PB4-7	149.49	2.07
PB4-8	253	2.09
PB5-1	14.6	1.89
PB5-14	11.4	1.9
PB5-17	33.8	1.85
PB5-18	14	1.89
PB5-7	81	1.83
PB5-9	235.89	2.03
PC1-1	210.77	2.03
PC1-2	242.67	2.07
PC1-3	110.99	2.1
PC1-5	183.78	2.07
PC1-6	8.9	1.81
PC1-8	61	1.83

PC1-9	132.15	1.99
PC2-1	116.78	2.03
PC2-2	368.68	1.99
PC2-3	173.43	2.05
PC2-5	173.14	2.06
PC2-6	348.92	2.02
PC2-7	209.37	2.08
PD1-1	499.18	1.92
PD1-2	309.46	2.01
PD1-3	1.9	1.8
PD1-5	72.2	1.8
PD1-6	80.7	1.92
PD1-7	454.01	1.95
PD1-9	298.42	1.98
PD2-10	76.7	1.91
PD2-11	107.97	2.05
PD2-12	77	1.83
PD2-15	429.13	4.416
PD2-16	296.27	1.91
PD2-17	201.46	1.82
PD2-18	58.1	1.86
PD2-4	44	1.86
PD2-5	47	1.89
PD2-7	58.3	1.8
PD2-8	48.6	1.85
PD2-9	169.18	2.01
PD3-1	48.6	1.9
PD3-11	202.57	2.05
PD3-2	47.1	1.88
PD3-3	31	1.93
PD3-5	158.93	2.15
PD3-9	60.7	1.87