Identificación de microorganismos cultivables de la piel de anuros, distribuidos al sur de la cordillera de los Andes y estribaciones orientales del Ecuador.

Romel Riofrío [1]
pblg2017026@uea.edu.ec

Cecilia Rodríguez-Haro PhD [1]
crodriguez@uea.edu.ec

[1]**Universidad Estatal Amazónica, Facultad Ciencias de la Vida, Carrera de Biología.**

Resumen

Los anfibios se encuentran expuestos a la transmisión de microorganismos provenientes de las plantas, suelo y agua. En los últimos años se han evidenciado que, en la piel de los anfibios, se alberga una gran diversidad de microorganismos y que en muchos casos pueden evitar la presencia de patógenos o a su vez inhibir su crecimiento. El presente estudio se realizó en 12 localidades del sur de la cordillera de los Andes y estribaciones orientales del Ecuador, teniendo como objetivo de estudio identificar los microorganismos cultivables de la piel de anuros. Se realizó la búsqueda de las especies de anuros para proceder a ser hisopados, tomando una muestra en medio líquido TGHL y otra en medio líquido cerebro corazón, para luego ser cultivados en el laboratorio de microbiología e identificados mediante la técnica MALDI-TOF. Se obtuvo 105 aislados de bacterias, provenientes de 38 individuos de anuros, estos aislamientos pertenecieron a 34 especies de bacterias, 18 géneros y 13 familias; en el caso de hongos se obtuvo 42 aislados, provenientes de 38 individuos de anuros, estos aislamientos pertenecieron a 10 especies de hongos, 5 géneros y 5 familias. Esta identificación permitió conocer la variabilidad de microorganismos de los diferentes hábitats donde se encontraban los hospederos, así mismo, conocer los reportes y utilidades mencionados en otros escritos.

Palabras Claves: microorganismos, anuros, piel, Andes, Ecuador

Abstract

Amphibians are exposed to the transmission of microorganisms from plants, soil, and water. In recent years, it has been shown that the skin of amphibians harbors a wide variety of microorganisms and that in many cases they can prevent the presence of pathogens or, in turn, inhibit their growth. The present study was carried out in 12 localities in the south of the Andes mountain range and the eastern foothills of Ecuador, with the objective of the study to identify the microorganisms that can be cultivated on the skin of anurans. Anuran species were searched for swabbing, taking a sample in TGHL liquid medium and another in brain-heart liquid medium, and then cultured in the microbiology laboratory and identified using the MALDI-TOF technique. 105 bacterial isolates were obtained from 38 individuals of anurans, these isolates belonged to 34 species of bacteria, 18 genders and 13 families; In the case of fungi, 42 isolates were obtained from 38 individuals of anurans. These isolates belonged to 10 species of fungi, 5 genders and 5 families. This identification to know the variability of microorganisms of the different habitats where the hosts were found, likewise, to know the reports and utilities mentioned in other writings.

Keywords: microorganisms, anurans, skin, Andes, Ecuador

1. Introducción

Ecuador es catalogado como uno de los países con mayor biodiversidad del mundo, debido a la presencia de la cordillera de los Andes que atraviesa el país de norte a sur, esto favorece la formación de diferentes ecosistemas. (Bravo-Velásquez 2014).

Actualmente, es uno de los países más diversos en cuanto a anfibiofauna, hasta el momento cuenta con 653 especies (Ron et al, 2021). Los anfibios cumplen roles muy importantes en los diferentes ecosistemas, como indicadores de calidad de ambiente y en la cadena de flujo de energía y nutrientes (Yánez y Estupiñán 2016).

Dentro de la clase Amphibia tenemos los órdenes: Anura, Caudata y Gymnophiona. El orden Anura (ranas y sapos) es el más numeroso dentro de esta clase taxonómica, cuenta con 623 especies en el Ecuador (Ron et al, 2021). Tienen hábitos acuáticos y terrestres, su morfología consiste en: extremidades posteriores largas, tronco corto y no exhiben cola en estado adulto (excepto machos de *Ascaphus truei*),estas características morfológicas los diferencian de los otros órdenes de anfibios (Parra-Olea, Flores-Villela, y Mendoza-Almeralla 2014).

Los anfibios del Ecuador están considerados entre los más amenazados de América del Sur, por la pérdida del hábitat y enfermedades emergentes que han causado declives y extinciones en todo el mundo. Una de las enfermedades que se ha convertido en amenaza más importante para especies del orden Anura es producida por un hongo quitridio (*Batrachochytrium dendrobatidis*), (Bosch, 2003).

Los Anuros dentro de su hábitat se encuentran expuestos a la transmisión de microorganismos provenientes de las plantas, suelo, agua y mediante el apareamiento. En los últimos años se ha evidenciado que, en la piel de los anfibios, se alberga una gran variedad de microorganismos y que en muchos casos pueden evitar la presencia de patógenos o a su vez inhibir su crecimiento. Estos microorganismos pueden ser mutualistas, limitando la infección por el hongo quitridio *Batrachochytrium dendrobatidis* (Walke et al., 2014).

También han reportado la producción de péptidos de la secreción cutánea de ciertos anuros, dichos péptidos tienen compuestos químicos con actividad biológica, que resultan interesantes en el desarrollo de nuevos fármacos y en otros campos de aplicación,

cabe señalar que la composición de estas moléculas está vinculada al microbiota presente en la piel de los anuros. (Proaño-Bolaños et al, 2019).

Han realizado estudios de bioensayos de secuenciación y de inhibición de *Batrachochytrium dendrobatidis*, para caracterizar comunidades de bacterias de la piel de ranas neotropicales,; luego de realizar el estudio descubrieron que estas ranas arborícolas tenían una estructura de la comunidad bacteriana, que difería de las otras comunidades de ranas más diversas (Rebollar et al, 2019).

Así mismo, Belden et al, (2015), realizó otro estudio para determinar las diferentes comunidades microbianas que habitan en algunas ranas de Panamá, lo cual encontró una variación en la comunidad microbiana de las especies muestreadas.

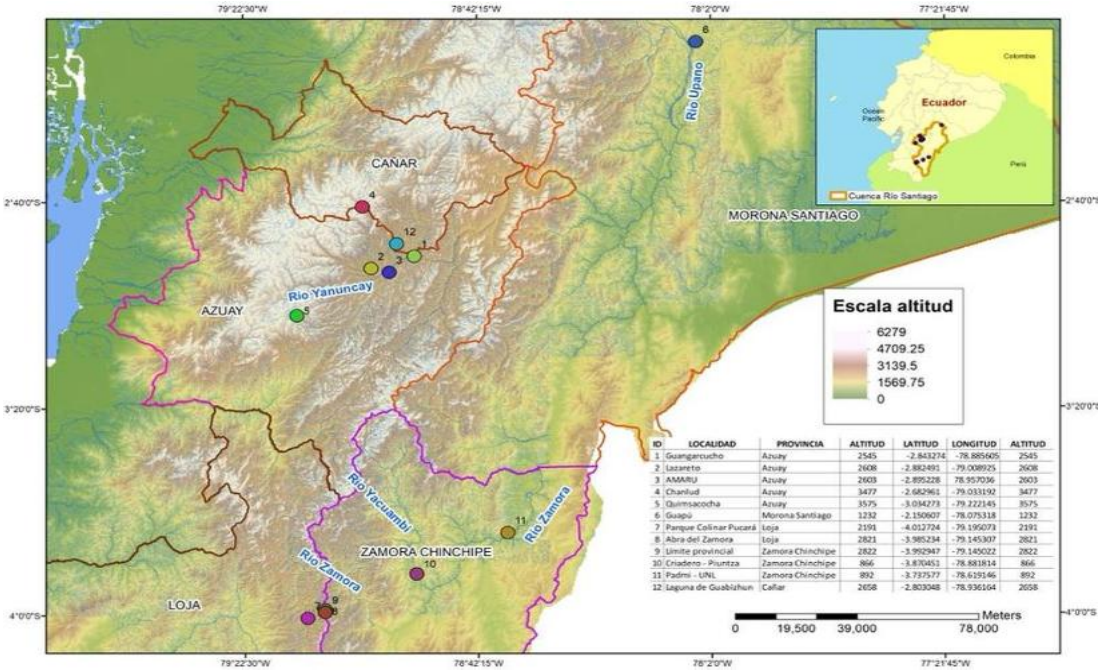
Algunos microorganismos pueden crecer en cualquier medio de cultivo, otros en medios específicos y otro grupo no puede crecer en ningún medio (Madigan et al., 2015). Walke et al., (2015) menciona que un estimado del 0,001% y el 15% de las bacterias pueden ser cultivadas en cualquier sistema dado con técnicas y medios de uso común, sin embargo, el cultivo es de vital importancia para las investigaciones.

Una de las técnicas de identificación de los microorganismos es por desorción láser asistida por la matriz con detección de masas (MALDI-TOF). Es una técnica gold standard, económica y rápida, que permite la identificación a nivel de género, especie o cepa, de aislados bacterianos, fúngicos y de virus (Siller-Ruiz et al. 2017). El presente trabajo de investigación tiene como objetivo identificar los microorganismos cultivables de la piel de anuros, considerando como lugar de estudio el sur de la cordillera de los Andes y estribaciones orientales en el Ecuador.

Los estudios y descripciones sobre caracterización e identificación de los microorganismos cultivables asociados a la piel de anuros en el Ecuador, en especial en la cordillera de los Andes son escasos. En este sentido el presente estudio, ampliará el conocimiento científico en referencia a la identificación y caracterización de microorganismos cultivables provenientes de la piel de anuros. Además, servirá de base para futuras investigaciones enfocadas a la identificación de microorganismos y al estudio de los principios bioactivos obtenidos de los mismos.

2. Metodología

2.1. Localización



ID	LOCALIDAD	PROVINCIA	ALTITUD	LATITUD	LONGITUD	ALTITUD
1	Guangarcucho	Azuay	2545	-2.843274	-78.885605	2545
2	Lazareto	Azuay	2608	-2.882491	-79.008925	2608
3	AMARU	Azuay	2603	-2.895228	78.957036	2603
4	Chanlud	Azuay	3477	-2.682961	-79.033192	3477
5	Quimsacocha	Azuay	3575	-3.034273	-79.222145	3575
6	Guapú	Morona Santiago	1232	-2.150607	-78.075318	1232
7	Parque Colinar Pucará	Loja	2191	-4.012724	-79.195073	2191
8	Abra del Zamora	Loja	2821	-3.985234	-79.145307	2821
9	Limite provincial	Zamora Chinchipe	2822	-3.992947	-79.145022	2822
10	Criadero - Piuntza	Zamora Chinchipe	866	-3.870451	-78.881814	866
11	Padmi - UNL	Zamora Chinchipe	892	-3.737577	-78.619146	892
12	Laguna de Guabizhun	Cañar	2658	-2.803048	-78.936164	2658

Figura 1. Lugares de muestreo

Fuente: Mobile Topographer 9.3.2 SF APPLICALITY LTD.

El estudio fue realizado entre los meses de septiembre y noviembre de 2021, en 12 localidades distribuidas al sur de la cordillera de los Andes y estribaciones orientales del Ecuador en las provincias de: Cañar, Azuay, Loja, Zamora Chinchipe y Morona Santiago, "i*n situ"*. Además de otras especies "e*x situ"*, que se encuentran en el Centro de Conservación de Anfibios "AMARU" en la ciudad de Cuenca (Fig. 1).

2.2. Diseño de investigación

La búsqueda de las especies de anuros siguió un diseño de investigación exploratorio, realizado mediante el método de parcelas de 10 * 10 metros y registros oportunos o casuales en las zonas descritas del área de estudio; en todos los muestreos se realizó la búsqueda con la ayuda de 3 personas expertas en Herpetofauna (MINAM, 2015). Las zonas de estudio consideradas fueron áreas en las cuales hubo registros previos de las especies por otros investigadores; cabe mencionar que, al ser un estudio exploratorio no se contó con un número exacto de especies al depender de la presencia

de las mismas, durante la fase de campo. Sin embargo, se consideró potencialmente algunas especies de anuros como objetivo de búsqueda.

2.3. Métodos de investigación

2.3.1. *Colección de muestras*

Los individuos fueron capturados a mano usando guantes de nitrilo para cada una de las especies de Anuros muestreadas. Posteriormente fueron hisopados con la ayuda de un hisopo estéril generando una ligera presión, técnica descrita por Rebollar et al., (2019) y Belden et al., (2015). Para dicho procedimiento se utilizó 2 hisopos, el primer hisopo fue colocado en un tubo Falcon™ de 50 mL estéril con un medio líquido TGHL (Triptona Gelatina Hidrolizada de Lactosa), mientras que el segundo hisopo fue colocado en el medio de cultivo liquido Cerebro Corazón.

Para el transporte de las muestras, se utilizó una caja térmica para mantener la cadena de frío, luego las muestras se trasladaron al laboratorio y fueron almacenadas a -80 °C, hasta que se realizó la siembra e identificación taxonómica.

2.3.2. *Cultivo en el laboratorio*

En el laboratorio de microbiología del Centro de Investigación, Innovación y Transferencia de Tecnología (CITT) de la Universidad Católica de Cuenca, se realizaron los cultivos axénicos o puros previa a su identificación. La esterilización de los medios de cultivo y los materiales se realizaron en autoclave, siguiendo las especificaciones de cada producto. La primera muestra proveniente del medio líquido cerebro corazón, se cultivó en una caja de petri con medio solido denominado Agar nutritivo HIMEDIA®, específico para el crecimiento de bacterias, a más de realizar siembras con diluciones de hasta 10-5 pasa evitar densidades altas en las colonias; el método de siembra fue por estriado. La segunda muestra del medio líquido TGHL, fue cultivada en un medio sólido papa Agar dextrosa PDA TM-MEDIA® y en otro medio solido TGHL suplementados con 250 mg/L de sulfato de estreptomicina respectivamente, en este caso el método de siembra fue por punción; en ambos casos se realizó la siembra en la cabina de bioseguridad para evitar la contaminación de las muestras.

Las bacterias aisladas se incubaron a una temperatura de 23 °C y por un tiempo de 24 a 48 horas. Posterior a ello se aisló y sembró sucesivamente hasta obtener colonias

puras, estas muestras fueron previamente clasificadas por tinción de gram y caracterizadas morfológicamente (Tortora et al., 2021).

En el caso de los hongos aislados se realizó la incubación a 23 °C y un tiempo de 24 a 48 horas. Además, se realizó siembras sucesivas para obtener cultivos puros, realizando clasificaciones morfológicas hasta lograr su correcto aislamiento.

Finalmente, fueron identificadas las bacterias y hongos taxonómicamente por la técnica MALDI – TOF.

2.3.3. *Análisis descriptivo*

El número de bacterias y hongos que se logren identificar de cada una de las especies muestreadas (Tabla 1 y 2).

3. Resultados y Discusión

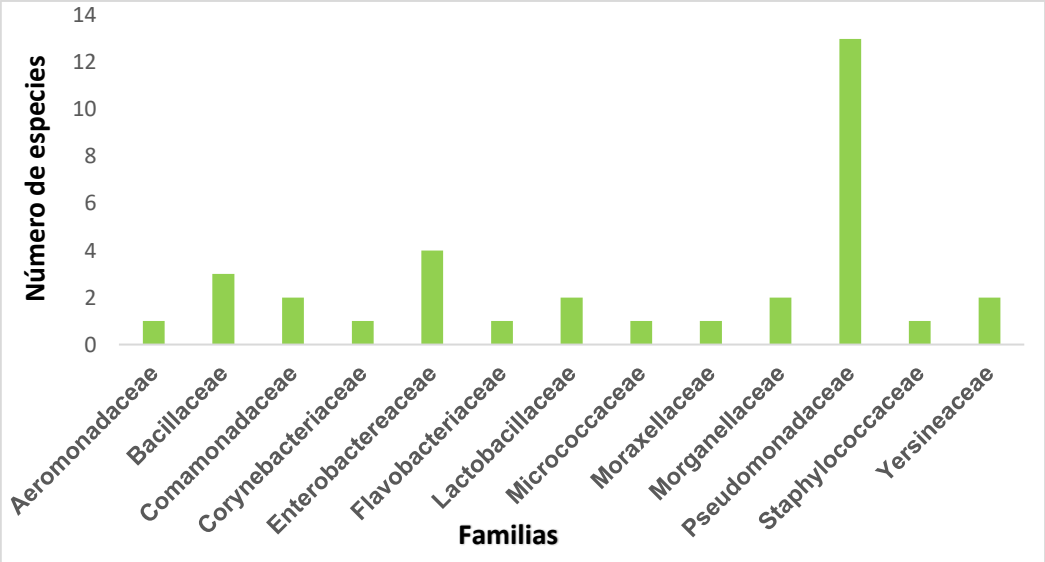


Figura 2. Número de especies de bacterias pertenecientes a cada familia.

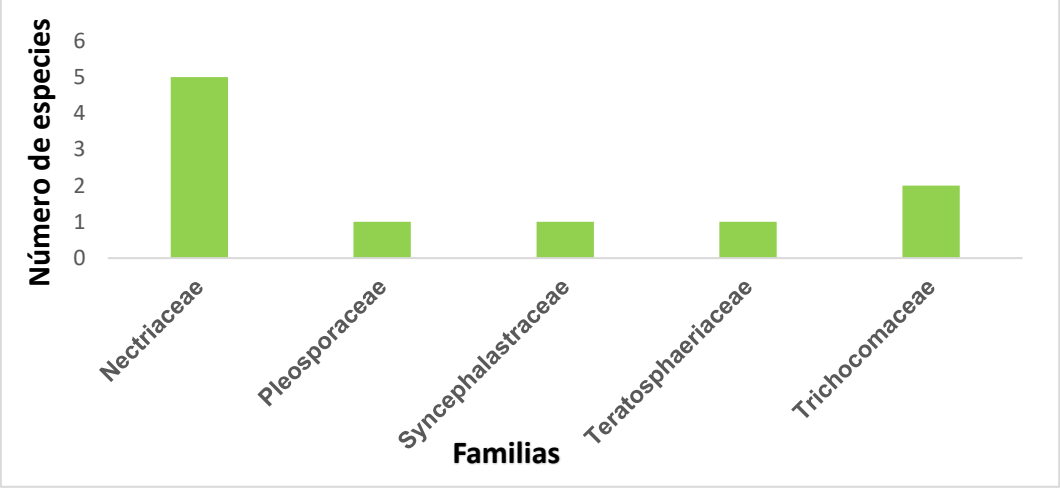


Figura 3. Número de especies de hongos pertenecientes a cada familia.

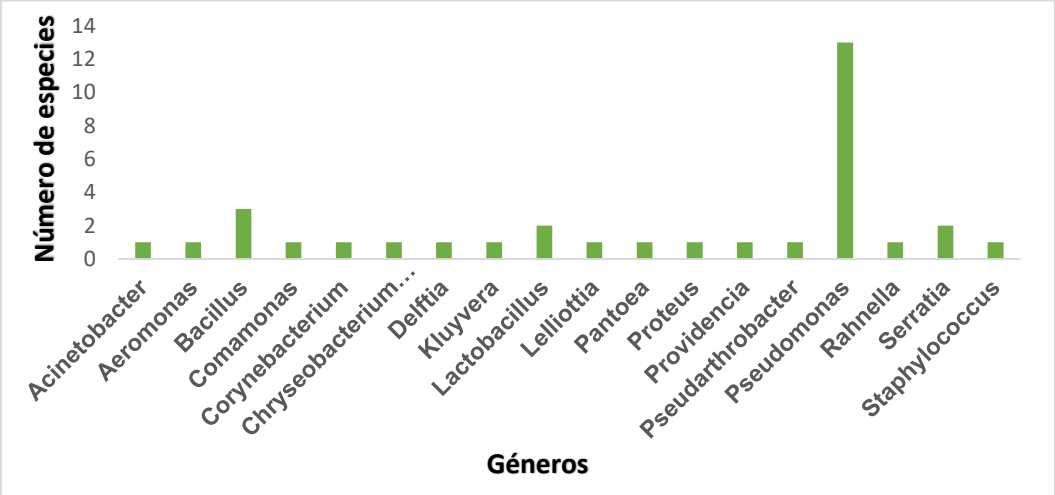


Figura 4. Número de especies de bacterias pertenecientes a cada género.

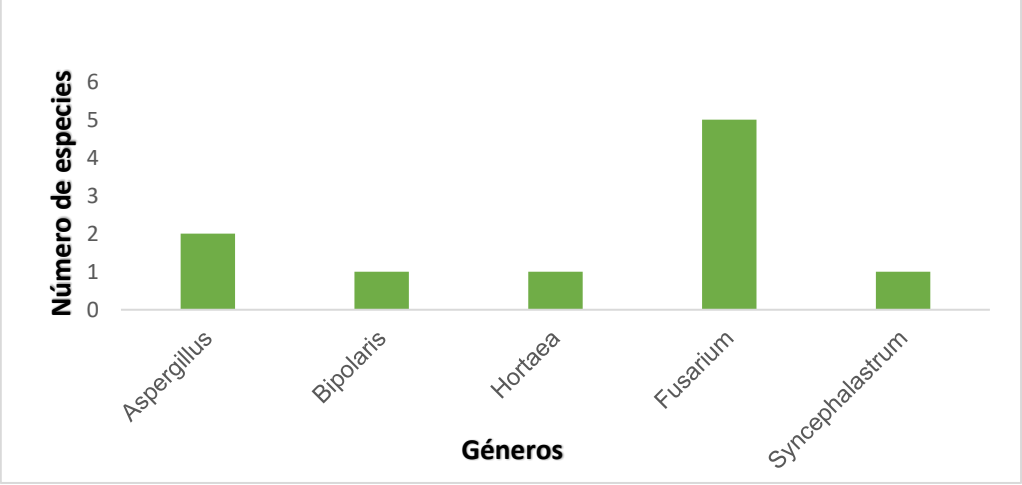


Figura 5. Número de especies de hongos pertenecientes a cada género.

Se aisló a 105 bacterias, provenientes de 38 individuos de anuros, estos aislamientos pertenecieron a 34 especies de bacterias, 18 géneros y 13 familias (tabla 1).

Pristimantis diadematus, proveniente de la localidad Padmi (Zamora Chinchipe), fue el individuo con mayor número de aislamientos bacterianos (6 especies); las posibles razones para que este espécimen haya obtenido un mayor número de especies bacterianas son: las condiciones edafoclimáticas de la amazonia, idóneas para el crecimiento de microorganismos y otra posible razón es una buena adaptabilidad de estos microorganismos a las condiciones de laboratorio. Otras especies de anuros que siguieron a *Pristimantis diadematus* en mayor número de aislamientos fueron: *Hyloxalus vertebralis y Gastrotheca pseustes* provenientes de dos localidades de la provincia del Azuay, con 5 especies de bacterias; mientras que las muestras tomadas de las especies: *Pristimantis samaniegoi* de la provincia de Loja y *Pristimantis vidua* de la provincia de Zamora, no se pudo realizar ningún aislamiento tanto de bacterias como de hongos. En el caso de bacterias, Vartoukian et al., (2010), menciona que una mínima cantidad de bacterias se puede cultivar, algunas de ellas requieren medios específicos y condiciones ambientales estrictas simuladas para su crecimiento; siendo una posible razón de no haber obtenido crecimiento de microorganismos de dichas muestras.

Se estima que solo se pueden cultivar entre el 0,001% y el 15% de las bacterias en cualquier sistema dado a través de técnicas y medios de uso común (Walke et al., 2015), en un estudio de microbiota de la piel de anfibios realizado por este autor, solo pudo cultivar un promedio de 0,59% de todo el microbioma y un -1,12% de la comunidad bacteriana de cada individuo. También sugiere utilizar un medio de cultivo recomendado para bacterias (R2A), bajo en nutrientes compatible con bacterias de crecimiento lento, que pueden ser rápidamente suprimidas por otras especies de crecimiento más rápido en el caso de utilizar medios ricos en nutrientes.

Las *Pseudomonas* (Fig. 4), fue el género más dominante con 13 especies bacterianas. Este género ya ha sido reportado en algunos otros estudios: Bresciano et al., (2015) mediante un estudio de microbiota en la cordillera de los Andes reportó especies de dicho género; Kruger, (2020), reportó 6 especies de *Pseudomonas* en aislamientos de *Lithobates clamitans* en Nueva Jersey; Walke et al., (2015), mediante una caracterización de microbiota de la piel de anfibios también reportó para su estudio.

También se pudo describir especies bacterianas que se encontraban presentes en distintas muestras de anuros de localidades con condiciones edafoclimáticas similares y distintas. *Pseudomonas chlororaphis* se encontró presente en 15 muestras de anuros independientemente de sus características ambientales; *P. fluorescens* estuvo presente en 7 muestras con una ligera variación, 6 de ellas fueron de localidades de altura provenientes de la provincia de Azuay y una séptima muestra de la provincia de Zamora Chinchipe de una altitud de 892 msnm; este género *Pseudomonas* ha sido descrito por Estupiñán-Torres et al., (2017) como un género muy diverso encontrado en diferentes hábitats debido a su gran facilidad de adaptación, que le permite adecuar el ambiente donde se encuentra para utilizar diferentes fuentes de carbono o nitrógeno para su nutrición . *Acinetobacter iwoffii* también estuvo presente en 7 muestras tomadas de la provincia de Azuay, en donde los hospederos comparten ciertas condiciones de vida a más de encontrarse en un rango altitudinal de 2000 a 3600 m.s.n.m., altitud superior al resto de muestras. Así mismo, se pudo encontrar otras especies con menor frecuencia o a su vez encontradas en una sola muestra; todo esto es explicado por la gran diversidad de ecosistemas y una diferente composición de especies según Bravo Velásquez, (2014), en este caso los anuros presentes a lo largo de la cordillera de los Andes y estribaciones del Ecuador, sirvieron de hospederos para los diferentes microorganismos existentes.

Recientemente, Kruger, (2020), reportó un estudio de inhibición de *Batrachochytrium dendrobatidis* por comunidades bacterianas aisladas de *Lithobates clamitans* y de muestras ambientales tomadas de la zona de estudio en la ciudad de Nueva Jersey. Identificaron 17 aislamientos bacterianos únicos tanto de muestras de ranas como del ambiente que exhibieron una actividad anti *Batrachochytrium dendrobatidis*, que podría utilizarse potencialmente en la terapia con probióticos para disminuir la susceptibilidad en anfibios, mencionando al género *Pseudomonas* como inhibidor contra este hongo también reportado en el presente estudio. Esto sugiere que existe un intercambio de microorganismos entre los anfibios y el ambiente en donde habitan.

En una investigación, Woodhams et al., (2018) aisló la bacteria *Serratia marcescens* de ranas cautivas originarias de Panamá, posterior a ello realizó un estudio que le permitió detectar un metabolito secundario denominado prodigiosina, que al aplicar a Cultivos de hongos quítridos como *Batrachochytrium dendrobatidis* y *Batrachochytrium salamandrivorans* provocó una inhibición significativa del

crecimiento, con concentraciones inhibitorias mínimas (MIC) de 10 y 50 μM; *Serratia marcescens* también fue reportada en nuestro estudio, proveniente de *Gastrotheca cuencana*, muestra tomada en la provincia del Azuay, localidad Guangarcucho; hábitat descrito como pastizal.

Proença et al., (2021) realizó otro estudio de caracterización del microbiota cultivable de la piel de la nana *Pelophylax perezi*, en un ambiente contaminado por metales en Portugal, describiendo que esta rana es endémica y muy común; una vez caracterizada la microbiota también evaluó la capacidad que tienen estos microorganismos de producir polisacáridos. Mencionando que la mayor producción de biopelículas se da por los exopolisacáridos que podrían actuar como complemento de protección contra la entrada de contaminantes a través de la piel de los anfibios, de tal manera ayuda a estas especies de anfibios a sobrevivir en ambientes contaminados por metales, estando presente el género *Acinetobacter* en todas las muestras, describiendo una especie del género *Acinetobacter* en el presente estudio.

En el caso de hongos se obtuvo 42 aislados, provenientes de 38 individuos de anuros, estos aislamientos pertenecieron a 10 especies de hongos, 5 géneros y 5 familias (tabla 2).

Fusarium fue el género más dominante con 5 especies de hongos con una amplia distribución entre las muestras tomadas. *Pristimantis conspicillatus, Chiasmocleis bassleri, Lithobates catesbeianus, Pristimantis versicolor y Pristimantis diadematus* fueron los individuos con mayor número de aislamientos de hongos, con un total de 3 especies de hongos para cada espécimen muestreado; así mismo hubo muestras con menor proporción de especies y un total de 14 muestras que no hubo crecimiento.

En el caso de hongos de la piel de Anuros la información es limitada, debido a que la mayoría de estudios de microbiota son enfocados a bacterias y al hongo patógeno denominado *Batrachochytrium dendrobatidis*; no obstante, serán descritos otros reportes de los hongos encontrados en este estudio. En este contexto la caracterización de hongos de nuestro trabajo de investigación, servirá de base para futuros estudios o reportes de estos hongos en otros Anuros de manera especial en investigaciones realizadas en el sur de la cordillera de los Andes y estribaciones orientales.

3.1. Reportes de los microorganismos descritos, mencionado por otros autores.

3.1.1. *Bacterias.*

Acinetobacter iwoffii

En una caracterización de *Acinetobacter sp*. realizada en Polonia, fue reportada la especie *Acinetobacter iwoffii* como patógena para la carpa común (Kozińska et al., 2014).

Aeromonas bestiarum

Han realizado un estudio de caracterización de la susceptibilidad antimicrobiana a la ciprofloxacina de distintas *Aeromonas spp*., donde ha sido descrita la especie *Aeromonas bestiarum* en aislados de heces de *Sciurus vulgaris* (ardilla roja) (Dias et al., 2018).

Género *Bacillus*

Sus principales aplicaciones han sido en los cultivos agrícolas para el control de enfermedades, considerando cepas no patogénicas para el ser humano (Villarreal-Delgado et al., 2018).

Comamonas testosteroni

Es considerada como una de las bacterias más patógenas del género *Comamonas*, los resultados de análisis en algunos pacientes determinaron que pudo causar la neumonía en pacientes con síndrome de inmunodeficiencia (Steinberg et al., 2015).

Corynebacterium striatum

Han demostrado que tiene una alta variabilidad y capacidad adaptativa de los aislados y una multirresistencia a los antibióticos (Renom et al., 2014).

Delftia acidovorans

Esta bacteria puede causar infección en pacientes inmunocompetentes; en aquel reporte, describieron a un paciente con leucemia linfoblástica de células B y neumonía (Bilgin et al., 2015).

Kluyvera ascorbata

Aislada de la afluencia principal de la planta de tratamiento de aguas residuales en el Hospital de China Occidental, Chengdu; mediante análisis demostraron que tenía resistencia a la colistina (Zhao & Zong, 2016).

Lactobacillus curvatus

Lactobacillus curvatus aislado de embutidos fermentados del Sudeste de África; mediante un estudio han podido demostrar que tiene un gran potencial probiótico in vitro como inhibidor frente a patógenos (Petrović et al., 2021).

Lactobacillus jensenii

En este estudio mostraron que *Lactobacillus jensenii* tiene actividad antimicrobiana contra aislados clínicos de *Escherichia coli* y *Candida albican*, además de interrumpir la formación de biopelículas preformadas de microorganismos en concentraciones variables (Morais et al., 2017).

Lelliottia amnigena

Mediante estudios han demostrado que *Lelliottia amnigena* tiene un gran potencial para mejorar el crecimiento del trigo bajo suelo salino; promoviendo el crecimiento vegetal y ayudando a la solubilización del Fosforo (El-Akhdar et al., 2020).

Pantoea agglomerans

Ha sido reportada como promotora del crecimiento vegetal, también en diversas aplicaciones biotecnológicas, como recuperación de crudo, área médica, industria de los alimentos y en el área agropecuaria (Chávez González et al., 2017).

Proteus mirabilis

Proteus mirabilis ha sido considerado como uno de los principales patógenos causantes de infecciones del tracto urinario y sepsis, además muestra resistencia a una amplia gama de β-lactámicos (Beltrão et al., 2021).

Providencia rettgeri

Aislaron muestras de suelo de una mina de carbón en Huainan, China. Mediante estudios proteómicos determinaron que la cepa de *Providencia rettgeri* HF16 podría ser

un biocatalizador adecuado para la biorremediación de selenita y acelerante de la eficiencia y síntesis económica de nanopartículas de selenio (Huang et al., 2021).

Pseudarthrobacter oxydans

Realizaron estudios de tolerancia al mercurio y tolerancia a los antibióticos, en donde cepas de *Pseudarthrobacter oxydans* mostraron tolerancia al mercurio; así mismo, resistencia a algunos antibióticos (Mechirackal Balan et al., 2018).

Género *Pseudomona*

El género *Pseudomonas* está conformado por un gran número de especies. Son bacilos Gram negativos, aerobios, oxidasas positivas que debido a su metabolismo tienen una gran facilidad de adaptación. Además de tener una gran adhesión celular que les permite la formación de biopelículas y las protege de la fagocitosis o de iones libres. Son colonizadoras de diferentes ambientes, han sido descritas como patógenos, por causar problemas para la salud como patologías de consideración (Estupiñán-Torres et al., 2017).

Rahnella aquatilis

Reportaron un caso de una mujer con una enfermedad de células falciformes que desarrolló shock séptico, causado por una infección por *Rahnella aquatilis* asociada con un inserto periférico de catéter venoso central. (Gaitán & Bronze, 2010).

Serratia liquefaciens

Mediante aislamientos pudieron encontrar *Serratia liquefaciens* en salmón ahumado en frio, indicando un alto potencial de adaptación y capacidad para deteriorar los alimentos (Begrem et al., 2021).

Staphylococcus xylosus

Detectaron *Staphylococcus xylosus* en un paciente de 70 años tomadas de una articulación con sospecha de infección de prótesis articular (Brand & Rufer, 2021).

3.1.2. *Hongos*

Aspergillus flavus

Ha sido considerado como microbio queratinolítico, que se puede utilizar en el tratamiento de desechos queratináceos para lograr beneficios de remediación; en este caso lo utilizaron para la descomposición de plumas de pollo (Masood et al., 2021).

Aspergillus niger

Aspergillus niger es un hongo productor de la enzima celulasa. La celulasa tiene diversas aplicaciones: en la industrias textil, papelera, alimentaria y de biocombustibles (Siva et al., 2022).

Bipolaris sp.

Bipolaris sp. ha sido descrito como prometedor micoherbicida para controlar un pasto anual invasivo *Microstegium vimineum* (hierba estilete japonesa) (Kleczewski & Flory, 2010).

Hortaea werneckii

Hortaea werneckii ha sido reportada como causante de micosis cutánea en humanos conocida como la tiña negra (*Tinea nigra*), Sabatini, (2020) describe que esta enfermedad no ha sido común en países tropicales o subtropicales hasta la fecha de publicación del documento.

Género *Fusarium*

Fusarium es conocido por ser fitopatógeno, responsable del marchitamiento vascular en las plantas. Mediante un estudio de aislamientos de Fusarium spp. Inoculados en diferentes hospederos vegetales y un hospedero animal (ratones). Mostraron que en el caso de las plantas no todos los síntomas fueron asociados al marchitamiento vascular, pero si hubo una colonización y necrosis de los haces vasculares; en el hospedero animal evidenciaron alteraciones en el comportamiento, infectando y colonizando diferentes órganos, así mismo generó la mortalidad en 5 casos de diferente origen y diferentes especies (Forero-Reyes et al., 2018).

Syncephalastrum sp.

Este hongo se encuentra en el medio ambiente y suelo tropical, como colonizadores y rara vez causando daño en humanos. La mayoría de los casos se

presentan en personas inmunodeprimidas, en pacientes con esteroides a largo plazo, diabetes o pacientes con malignidad. Han reportado dos casos raros de neumonía en Pakistán provocada por Syncephalastrum sp. (Irshad et al., 2020).

4. Conclusiones

El estudio de identificación de microorganismos que pueden ser cultivables, permitió conocer las diferentes especies de bacterias y hongos presentes en los anuros muestreados en las diferentes localidades del sur de la cordillera de los Andes y estribaciones orientales.

Además, se logró observar la diversidad y variabilidad de microorganismos en función del hábitat de cada hospedero.

En el caso de bacterias se obtuvo un total 105 aislamientos, con 34 especies, pertenecientes a 18 géneros y 13 familias; en el caso de hongos fue menor sus aislamientos con un total de 42, 10 especies, pertenecientes a 5 géneros y 5 familias.

También se pudo contrastar las especies encontradas en nuestro estudio con otros estudios similares. Finalmente se pudo describir los reportes y utilidades de los microorganismos en especies de anuros y en otros campos de aplicación descritas por otros autores.

5. Referencias Bibliográficas

Abushaheen, M. A., Muzaheed, Fatani, A. J., Alosaimi, M., Mansy, W., George, M., Acharya, S., Rathod, S., Divakar, D. D., Jhugroo, C., Vellappally, S., Khan, A. A., Shaik, J., & Jhugroo, P. (2020). Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance. *Disease-a-Month*, *66*(6). https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2020.100971

Antwis, R. E., Haworth, R. L., Engelmoer, D. J. P., Ogilvy, V., Fidgett, A. L., & Preziosi, R. F. (2014). Ex situ diet influences the bacterial community associated with the skin of red-eyed tree frogs (agalychnis callidryas). *PLoS ONE*, *9*(1), 1–8. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085563

Ariza-Montobbio, P., & Cuvi, N. (2020). Ecosystem-based adaptation in Ecuador: Good practices for adaptive co-management. *Ambiente e Sociedade*, *23*. https://doi.org/10.1590/1809-4422ASOC20180315R2VU2020L4AO

Bax, V., & Francesconi, W. (2019). Conservation gaps and priorities in the Tropical Andes biodiversity hotspot: Implications for the expansion of protected areas. *Journal of Environmental Management*, *232*(November 2018), 387–396. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.11.086

Begrem, S., Jérôme, M., Leroi, F., Delbarre-Ladrat, C., Grovel, O., & Passerini, D. (2021). Genomic diversity of Serratia proteamaculans and Serratia liquefaciens predominant in seafood products and spoilage potential analyses. *International Journal of Food Microbiology*, *354*(March). https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109326

Belden, L. K., Hughey, M. C., Rebollar, E. A., Umile, T. P., Loftus, S. C., Burzynski, E. A., Minbiole, K. P. C., House, L. L., Jensen, R. V., Becker, M. H., Walke, J. B., Medina, D., Ibáñez, R., & Harris, R. N. (2015). Panamanian frog species host unique skin bacterial communities. *Frontiers in Microbiology*, *6*(OCT), 1–21. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01171

Beltrão, E. M. B., De Oliveira, É. M., & Lopes, A. C. D. S. (2021). First report of blaGES-1 in Proteus mirabilis clinical isolates. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, *54*, 3–5. https://doi.org/10.1590/0037-8682-0864-2020

Bilgin, H., Sarmis, A., Tigen, E., Soyletir, G., & Mulazimoglu, L. (2015). Delftia acidovorans: A rare pathogen in immunocompetent and immunocompromised patients. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, *26*(5), 277–279. https://doi.org/10.1155/2015/973284

Bosch, J. (2003). Nuevas amenazas para los anfibios : enfermedades emergentes Nuevas amenazas para los anfibios : enfermedades emergentes. *Munibe*, *16*(16), 56–71. http://www.sosanfibios.org/descargas/Bosch03b.pdf

Brand, Y. E., & Rufer, B. (2021). Late prosthetic knee joint infection with Staphylococcus xylosus. *IDCases*, *24*, e01160. https://doi.org/10.1016/j.idcr.2021.e01160

Bravo Velásquez, E. (2014). *La biodiversidad en el Ecuador* (Editorial). Abya-Yala/UPS. https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/6788/1/La Biodiversidad.pdf

Bresciano, J. C., Salvador, C. A., Paz-y-Miño, C., Parody-Merino, A. M., Bosch, J., & Woodhams, D. C. (2015). Variation in the Presence of Anti-Batrachochytrium dendrobatidis Bacteria of Amphibians Across Life Stages and Elevations in Ecuador. *EcoHealth*, *12*(2), 310–319. https://doi.org/10.1007/s10393-015-1010-y

Chávez González, J. D., Rodríguez Barrera, M. Á., Romero Ramírez, Y., Ayala Sánchez, A., Ruvalcaba Ledezma, J. C., & Toribio-Jiménez, J. (2017). Pantoea agglomerans productora de biosurfactante aislada de rizosfera de pastos Tanzania y Llanero. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, *7*(4), 961. https://doi.org/10.29312/remexca.v7i4.281

Cuesta, S. A., Reinoso, C., Morales, F., Pilaquinga, F., Morán-Marcillo, G., Proaño-Bolaños, C., Blasco-Zúñiga, A., Rivera, M., & Meneses, L. (2021). Novel antimicrobial cruzioseptin peptides extracted from the splendid leaf frog, Cruziohyla calcarifer. *Amino Acids*, *53*(6), 853–868. https://doi.org/10.1007/s00726-021-02986-w

Cuesta, S., Gallegos, F., Arias, J., Pilaquinga, F., Blasco-Zúñiga, A., Proaño-Bolaños, C., Rivera, M., & Meneses, L. (2019). Molecular modeling of four Dermaseptin-related peptides of the gliding tree frog Agalychnis spurrelli. *Journal of Molecular Modeling*, *25*(9), 1–12. https://doi.org/10.1007/s00894-019-4141-1

Dias, C., Borges, A., Saavedra, M. J., & Simões, M. (2018). Biofilm formation and

multidrug-resistant Aeromonas spp. from wild animals. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, *12*(2010), 227–234. https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.09.010

El-Akhdar, I., Elsakhawy, T., & Abo-Koura, H. A. (2020). Alleviation of Salt Stress on Wheat (Triticum aestivum L.) by Plant Growth Promoting Bacteria strains Bacillus halotolerans MSR-H4 and Lelliottia amnigena MSR-M49. *Journal of Advances in Microbiology*, *20*(1), 44–58. https://doi.org/10.9734/jamb/2020/v20i130208

Estupiñán-Torres, S. M., Ávila de Navia, S. L., López Orozco, Y. L., Martínez Méndez, S. L., Miranda Marín, Y. Y., & Ortegón Puentes, A. A. del P. (2017). Aislamiento e identificación de Pseudomonas sp. y Aeromonas sp. en aguas de piscinas públicas de Bogotá – Colombia. *Nova*, *15*(27), 25. https://doi.org/10.22490/24629448.1955

Forero-Reyes, C. M., Alvarado-Fernández, A. M., Ceballos-Rojas, A. M., González-Carmona, L. C., Linares-Linares, M. Y., Castañeda-Salazar, R., Pulido-Villamarín, A., Góngora-Medina, M. E., Cortés-Vecino, J. A., & Rodríguez-Bocanegra, M. X. (2018). Evaluation of Fusarium spp. pathogenicity in plant and murine models. *Revista Argentina de Microbiologia*, *50*(1), 90–96. https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.11.009

Gaitán, J. I., & Bronze, M. S. (2010). Infection caused By Rahnella aquatilis. *American Journal of the Medical Sciences*, *339*(6), 577–579. https://doi.org/10.1097/MAJ.0b013e3181dd0cca

García - Oviaño, M., Rodríguez - Sánchez, B., & Caballero - Pérez, Juan de Dios Muñoz - Bellido, J. L. (2018). Aplicaciones de la espectrometría de masas MALDI-TOF en Microbiología Clínica Editores. In Editores, E. Mansilla Cercenado, & R. Cantón Moreno (Eds.), *Procedimiento de Microbiología clínica* (pp. 255–263). Irycis. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814451-0.00017-4

Gonçalves, V. N., Carvalho, C. R., Amorim, S. S., Menezes, G. C. A. de, Vitoreli, G. A., Assis, J. C., & Rosa, L. H. (2018a). Microbiologia Industrial - Bioprocessos. In *Elsevier* (Vol. 1, pp. 1–940).

Gonçalves, V. N., Carvalho, C. R. de, Amorim, S. S., Menezes, G. C. A. de, Vitoreli, G. A., Assis, J. C. S. de, & Rosa, L. H. (2018b). Biologia e Biotecnologia de Fungos. In R. P. do Nascimento, B. D. Ribeiro, K. S. Pereira, & M. A. Z. Coelho (Eds.), *Microbiología industrial bioprocessos* (pp. 213–265). Elsevier Brasil.

Huang, S. W., Wang, Y., Tang, C., Jia, H. L., & Wu, L. (2021). Speeding up selenite bioremediation using the highly selenite-tolerant strain Providencia rettgeri HF16-A novel mechanism of selenite reduction based on proteomic analysis. *Journal of Hazardous Materials*, *406*(November 2020), 124690. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124690

Irshad, M., Nasir, N., Hashmi, U. H., Farooqi, J., & Mahmood, S. F. (2020). Invasive pulmonary infection by Syncephalastrum species: Two case reports and review of literature. *IDCases*, *21*, e00913. https://doi.org/10.1016/j.idcr.2020.e00913

Jervis, P., Pintanel, P., Hopkins, K., Wierzbicki, C., Shelton, J. M. G., Skelly, E., Rosa, G. M., Almeida-Reinoso, D., Eugenia-Ordoñez, M., Ron, S., Harrison, X., Merino-

Viteri, A., & Fisher, M. C. (2021). Post-epizootic microbiome associations across communities of neotropical amphibians. *Molecular Ecology*, *30*(5), 1322–1335. https://doi.org/10.1111/mec.15789

Kleczewski, N. M., & Flory, S. L. (2010). Leaf blight disease on the invasive grass microstegium vimineum caused by a Bipolaris sp. *Plant Disease*, *94*(7), 807–811. https://doi.org/10.1094/PDIS-94-7-0807

Kozińska, A., Paździor, E., Pękala, A., & Niemczuk, W. (2014). Acinetobacter johnsonii and Acinetobacter lwoffii - The emerging fish pathogens. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, *58*(2), 193–199. https://doi.org/10.2478/bvip-2014-0029

Kruger, A. (2020). Functional Redundancy of Batrachochytrium dendrobatidis Inhibition in Bacterial Communities Isolated from Lithobates clamitans Skin. *Microbial Ecology*, *79*(1), 231–240. https://doi.org/10.1007/s00248-019-01387-7

L'Ollivier, C., & Ranque, S. (2016). MALDI-TOF-Based Dermatophyte Identification. *Mycopathologia*, *182*(1–2), 183–192. https://doi.org/10.1007/s11046-016-0080-x

Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., & Stahl, D. A. (2015). Brock - Biologia de los microorganismos. In *Metabolismo microbiano* (14th ed., pp. 77–110). PEARSON EDUCACIÓN S. A.

Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (2006). *Brock - Biologia De Los Microorganismos 10ª Ed by Kalu.pdf* (10th ed.). Pearson.

Masood, S., Hussain, A., Javid, A., Bukahri, S. M., Ali, W., Ali, S., Ghaffar, I., Imtiaz, A., Amin, H. M. A., Salahuddin, H., Inayat, M., Razzaq, S., Kafayat, F., Rafiq, H., Yasmeen, M., Muneeb, M., & Sattar, S. (2021). Fungal decomposition of chicken-feather waste in submerged and solid-state fermentation. *Brazilian Journal of Biology = Revista Brasleira de Biologia*, *83*, e246389. https://doi.org/10.1590/1519-6984.246389

Mechirackal Balan, B., Shini, S., Krishnan, K. P., & Mohan, M. (2018). Mercury tolerance and biosorption in bacteria isolated from Ny-Ålesund, Svalbard, Arctic. *Journal of Basic Microbiology*, *58*(4), 286–295. https://doi.org/10.1002/jobm.201700496

Ministerio del Ambiente. MINAM. (2015). Guía de inventario de la fauna silvestre. In *Resolución Ministerial N° 057-2015-MINAM*. zona comunicaciones S. A. C. http://www.minam.gob.pe/patrimonio-natural/wp-content/uploads/sites/6/2013/10/GUÃ-A-DE-FAUNA-SILVESTRE.compressed.pdf

Morais, I. M. C., Cordeiro, A. L., Teixeira, G. S., Domingues, V. S., Nardi, R. M. D., Monteiro, A. S., Alves, R. J., Siqueira, E. P., & Santos, V. L. (2017). Biological and physicochemical properties of biosurfactants produced by Lactobacillus jensenii P6A and Lactobacillus gasseri P65. *Microbial Cell Factories*, *16*(1), 1–15. https://doi.org/10.1186/s12934-017-0769-7

Ortega-Andrade, H. M., Rodes Blanco, M., Cisneros-Heredia, D. F., Guerra Arévalo, N., López De Vargas-Machuca, K. G., Sánchez-Nivicela, J. C., Armijos-Ojeda, D., Andrade, J. F. C., Reyes-Puig, C., Riera, A. B. Q., Székely, P., Soto, O. R. R., Székely, D., Guayasamin, J. M., Pesántez, F. R. S., Amador, L., Betancourt, R.,

Ramírez-Jaramillo, S. M., Timbe-Borja, B., … Muñoz, M. H. Y. (2021). Red List assessment of amphibian species of Ecuador: A multidimensional approach for their conservation. *PLoS ONE*, *16*(5 May), 1–28. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251027

Parra-Olea, G., Flores-Villela, O., & Mendoza-Almeralla, C. (2014). Biodiversity of amphibians in Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, *85*(SUPPL.), 460–466. https://doi.org/10.7550/rmb.32027

Petrović, T. Ž., ILIĆ, P., GRUJOVIĆ, M., MLADENOVIĆ, K., KOCIĆ-TANACKOV, S., & ČOMIĆ, L. (2021). Lactobacillus curvatus from fermented sausages as new probiotic functional foods. *Food Science and Technology*, *2061*. https://doi.org/10.1590/fst.17121

Proaño-Bolaños, C., Blasco-Zúñiga, A., Almeida, J. R., Wang, L., Llumiquinga, M. A., Rivera, M., Zhou, M., Chen, T., & Shaw, C. (2019). Unravelling the skin secretion peptides of the gliding leaf frog, Agalychnis spurrelli (hylidae). *Biomolecules*, *9*(11), 1–20. https://doi.org/10.3390/biom9110667

Proença, D. N., Fasola, E., Lopes, I., & Morais, P. V. (2021). Characterization of the skin cultivable microbiota composition of the frog pelophylax perezi inhabiting different environments. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *18*(5), 1–13. https://doi.org/10.3390/ijerph18052585

Rebollar, E. A., Bridges, T., Hughey, M. C., Medina, D., Belden, L. K., & Harris, R. N. (2019). Integrating the role of antifungal bacteria into skin symbiotic communities of three Neotropical frog species. *Isme Journal*, *13*(7), 1763–1775. https://doi.org/10.1038/s41396-019-0388-x

Renom, F., Gomila, M., Garau, M., Gallegos, M. D. C., Guerrero, D., Lalucat, J., & Soriano, J. B. (2014). Respiratory infection by Corynebacterium striatum: Epidemiological and clinical determinants. *New Microbes and New Infections*, *2*(4), 106–114. https://doi.org/10.1002/nmi2.48

Ron, S. R., Merino, A. & Ortiz, D. A. 2021. Anfibios del Ecuador. Versión 2021.0. Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Recuperado de https://bioweb.bio/faunaweb/amphibiaweb/. Consultado: (2022, enero 28).

Rosas Arango, S., Ostos Ortíz, O., & González, J. (2018). Aplicaciones biotecnológicas de los microorganismos. *Nova*, *17*(31), 129–163. http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S1794-24702019000100129&script=sci_abstract&tlng=en

Sabatini, N. (2020). Tiña negra (tinea nigra): comunicación de un caso alóctono en Chile. *Archivos Argentinos de Pediatria*, *118*(1), 90–93. https://doi.org/10.5546/aap.2020.73

Sf Applicality Ltd (2022). Mobile Topographer (Versión 9.3.2) [Aplicación móvil]. https://mobile-topographer.uptodown.com/android/descargar.

Siva, D., Srivethi, G., Vasan, P. T., Rajesh, D., Alfarhan, A., & Rajagopal, R. (2022). Enhanced cellulase enzyme production by Aspergillus niger using cellulase/iron oxide magnetic nano-composites. *Journal of King Saud University - Science*, *34*(1),

101695. https://doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101695

Steinberg, J. P., Burd, E. M., & Principles, B. (2015). *Comamonas testosteroni Other Gram-Negative and Gram-Vari- able Bacilli*.

Tapia - Nuñez, L. (2016). *Norma para suscripción de contratos de acceso a recursos genéticos*. 34.

Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2021). Microbiology An Introduction. In *Microbial growth* (13th ed., pp. 177–203). © Pearson Education Limited 2021.

Vartoukian, S. R., Palmer, R. M., & Wade, W. G. (2010). Strategies for culture of "unculturable" bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, *309*(1), 1–7. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.02000.x

Villarreal-Delgado, M. F., Villa-Rodríguez, E. D., Cira-Chávez, L. A., Estrada-Alvarado, M. I., Parra-Cota, F. I., & De los Santos-Villalobos, S. (2018). El género Bacillus como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, *36*(1), 95–130. https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1706-5

Walke, J. B., Becker, M. H., Hughey, M. C., Swartwout, M. C., Jensen, R. V., & Belden, L. K. (2015). Most of the dominant members of amphibian skin bacterial communities can be readily cultured. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*(19), 6589–6600. https://doi.org/10.1128/AEM.01486-15

Walke, J. B., Becker, M. H., Loftus, S. C., House, L. L., Cormier, G., Jensen, R. V., & Belden, L. K. (2014). Amphibian skin may select for rare environmental microbes. *ISME Journal*, *8*(11), 2207–2217. https://doi.org/10.1038/ismej.2014.77

Woodhams, D. C., LaBumbard, B. C., Barnhart, K. L., Becker, M. H., Bletz, M. C., Escobar, L. A., Flechas, S. V., Forman, M. E., Iannetta, A. A., Joyce, M. D., Rabemananjara, F., Gratwicke, B., Vences, M., & Minbiole, K. P. C. (2018). Prodigiosin, Violacein, and Volatile Organic Compounds Produced by Widespread Cutaneous Bacteria of Amphibians Can Inhibit Two Batrachochytrium Fungal Pathogens. *Microbial Ecology*, *75*(4), 1049–1062. https://doi.org/10.1007/s00248-017-1095-7

Yánez, P., & Estupiñán, S. (2016). Actividades antropogénicas y la dinámica de la quitridiomicosis como enfermedad infecciosa de anfibios neotropicales. *La Granja: Revista de Ciencias de La Vida*, *24(2)*. https://doi.org/10.17163/lgr.n24.2016.10

Zhao, F., & Zong, Z. (2016). Kluyvera ascorbata strain from hospital sewage carrying the mcr-1 colistin resistance gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *60*(12), 7498–7501. https://doi.org/10.1128/AAC.01165-16

6. Anexos

6.1. Fundamentación Teórica

6.1.1. *Cordillera de los Andes y condiciones geográficas*

Los Andes tropicales se extiende desde el oeste de Venezuela hasta el norte de Chile y Argentina, siguiendo la cordillera andina desde aproximadamente los 600 metros sobre el nivel del mar (Ariza-Montobbio & Cuvi, 2020). Dicha formación Andina ha sido identificada como el hotspot líder, lo que la convierte en una región prioritaria para la planificación de la conservación y los esfuerzos de investigación (Bax & Francesconi, 2019).

De una manera más específica, según la evaluación de la lista roja de especies de anfibios de Ecuador presentada por Ortega-Andrade et al, (2021), se puede observar que existe una gran diversidad de anfibios a lo largo de la cordillera de los Andes y estribaciones. Además de existir ciertas variaciones en la composición de especies debido a las variaciones climáticas y de ecosistemas. Por otra parte, en comparación con otros vertebrados, los anfibios muestran un grado mayor de amenaza. En el caso del Ecuador los anfibios están considerados entre los más amenazados de América del Sur, por la pérdida de hábitat causada por actividades antropogénicas. No obstante, existen áreas de bajo impacto que se encuentran aisladas, que tienen relación con áreas protegidas, bosques inaccesibles y cadenas montañosas (noroeste de Ecuador, el Amazonas, estribaciones de los Andes y el sur de la Amazonia) (Ortega-Andrade et al., 2021).

6.1.2. *Anfibios: Anuros*

Los anfibios son considerados como animales más conspicuos de los trópicos, cumplen roles muy importantes dentro del funcionamiento de los diferentes ecosistemas, se encuentran en un eslabón intermedio en la cadena de flujo de energía y nutrientes. Ecuador se encuentra en el tercer lugar a nivel mundial en cuanto a anfibiofauna con un total de 645 especies, después de Brasil y Colombia (Ron et al, 2021).

Ortega-Andrade et al. (2021), realizaron una evaluación de la Lista Roja Nacional para las especies de anfibios de Ecuador. Basándose en metodologías estandarizadas, evaluando el riesgo de extinción, se identificaron las principales amenazas para todos los anfibios nativos ecuatorianos, utilizando categorías y criterios de la Lista Roja de la UICN.

En esta evaluación encontraron que: el 57 % se encuentran en la categoría de amenazado, el 12% como casi amenazado, el 4% en el grupo de datos insuficientes y el 27% como preocupación menor. Concluyen con el estudio mencionando que el número de especies amenazadas en comparación con evaluaciones anteriores fue mayor(Ortega-Andrade et al., 2021).

Dentro de la clase Amphibia tenemos los órdenes: Anura, Caudata y Gymnophiona. El orden Anura (ranas y sapos) es el más numeroso dentro de esta clase taxonómica, cuenta con 623 especies en el Ecuador (Ron et al, 2021). Tienen hábitos acuáticos y terrestres, su morfología consiste en: extremidades posteriores largas, tronco corto y no exhiben cola en estado adulto (excepto machos de *Ascaphus truei*),estas características morfológicas los diferencian de los otros órdenes de anfibios (Parra-Olea, Flores-Villela, y Mendoza-Almeralla 2014).

6.1.3. *Microbiota de la piel de los anfibios*

Dentro del dominio bacteria se puede encontrar una gran variedad de morfologías y fisiologías, no solo causantes de enfermedades, sino también grupos benéficos; algunos grupos de bacterias las podemos encontrar en el suelo, agua, y otras que viven sobre o dentro de plantas y animales (Madigan, Martinko, y Parker 2006).

Por otro lado, los hongos también son representados por un grupo muy diverso, dentro de estos grupos tenemos los hongos filamentosos macro y microscópicos formados por hifas, que juntos dan lugar al micelio, representan un grupo altamente microbiano diversificado en morfología, fisiología y genética, estos hongos filamentosos están presentes en todos los ecosistemas del mundo (Gonçalves, et al. 2018). Dentro del grupo de hongos filamentosos tenemos el filo Chytridiomycota, el cual parece representar un vínculo entre los reinos Fungi y Animalia (Gonçalves et al, 2018).

Uno de los patógenos fúngicos es *Batrachochytrium dendrobatidis* perteneciente al filo Chytridiomycota, impulsor del declive de biodiversidad de anfibios en todos los continentes inclusive en lugares con poca o nula intervención humana (Yánez & Estupiñán, 2016) y (Jervis et al., 2021).

Los anfibios dentro de su hábitat se encuentran expuestos a la transmisión de microorganismos provenientes de las plantas, suelo y agua (Antwis et al., 2014).

En los últimos años se ha evidenciado que, en la piel de los anfibios, se alberga una gran variedad de microorganismos cutáneos (Walke et al., 2014). Las bacterias asociadas a la piel de los anfibios pueden evitar la presencia de otros patógenos, estos microorganismos pueden tener un efecto antimicrobiano que inhiban el crecimiento de patógenos (Antwis et al., 2014).

6.1.4. *Medios de cultivo y cultivo de microorganismos.*

Los medios de cultivo son soluciones utilizadas en un laboratorio para el cultivo de microorganismos. Existen cultivos químicamente definidos y complejos, los medios definidos son preparados con cantidades precisas de compuestos orgánicos o inorgánicos que son purificados a un cierto volumen de agua destilada, mientras que los medios complejos pueden ser adecuados con diferentes sustancias que en este caso no se puede controlar su composición nutritiva exacta. Los medios selectivos están formados por compuestos que inhiben el crecimiento de algunos microorganismos, pero favorecen el crecimiento de otros (Madigan et al., 2015).

Actualmente, se estima que solo se pueden cultivar entre el 0,001% y el 15% de las bacterias en cualquier sistema dado con técnicas y medios de uso común (Walke et al., 2015).

Se encuentra una amplia variedad de medios de cultivo para el crecimiento de microorganismos en el laboratorio. La mayoría de medios se encuentran disponibles en fuentes comerciales que tienen componentes premezclados y solo se necesita la adición de un cierto volumen de agua destilada (Tortora et al., 2021).

6.1.5. *Técnicas de identificación de microorganismos*

Para la identificación mediante técnicas moleculares, se requiere acceso a recursos genéticos, que se basa en la aprobación de permisos del Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica (Tapia - Nuñez, 2016). Lo cual limitaría la realización del estudio por cuestiones de tiempo en su tramitación, de esta manera se prefiere el uso de (Matrix-assited laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry en español: desorción láser asistida por la matriz con detección de masas), MALDI-TOF, al ser una técnica permitida y viable en el contexto ecuatoriano.

MALDI-TOF es considerada como una técnica gold standard, económica y rápida (García - Oviaño, Rodríguez - Sánchez, Caballero - Pérez y Muñoz - Bellido, 2018). Esta técnica permite la detección de proteínas abundantes, en un rango de masa entre 2 y 20 kDa (Kilodalton), proteínas ribosomales y unas pocas proteínas de mantenimiento. Se puede obtener un espectro propio de un organismo y este organismo puede ser comparando con bases de datos e identificado a nivel de género, especie o cepa, de aislados bacterianos, fúngicos y de virus (L'Ollivier y Ranque, 2016 y Siller-Ruiz et al. 2017).

6.1.6. *Usos potenciales y aplicaciones en la actualidad de los microorganismos de la piel de los anuros.*

Existe una gran biodiversidad de microorganismos y con capacidades biosintéticas en condiciones ambientales específicas que pueden ser las probables soluciones para diferentes problemas. Estos microorganismos han sido utilizados en la industria de alimentos, industria química, tecnología ambiental, tecnología de materiales y tecnología médica (control biológico de enfermedades, producción de vacunas, antibióticos y productos bioterapéuticos) (Rosas Arango, Ostos Ortíz, y González 2018).

Las secreciones de la piel de ciertos anfibios tienen compuestos químicos con actividad biológica, que resultan interesantes en el desarrollo de nuevos fármacos (Cuesta et al, 2019). En virtud de que estos compuestos han demostrado una actividad que controla virus, células cancerosas, antitumoral, antidiabético, antioxidante y enzimático (Proaño-Bolaños et al, 2019). Tienen un amplia actividad antimicrobiana contra bacterias, hongos y protozoos; (Cuesta et al, 2019). Entre las moléculas que producen los anfibios: anuros, se tiene péptidos sintetizados y almacenados en glándulas granulares de la piel, (S. Cuesta et al., 2019), cabe señalar que estas moléculas están vinculadas a la microbiota presente en la piel de los anfibios: anuros.

Los agentes antimicrobianos juegan un papel importante en el control y la curación de enfermedades infecciosas (Abushaheen et al, 2020). Este hecho se valida con estudios que reportan el aislamiento, bioquímica y caracterización farmacológica de péptidos de ranas, que tienen potencial antitumoral o antinflamatorio, que inhiben el crecimiento de *Escherischia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella sp*. y *Pseudomonas aeruginosa*; así mismo potenciales activos contra el hongo quitrido (Cuesta et al, 2021).

Tabla 1: Lista de bacterias descritas.

Nro. Muestra	Provincia	Localidad	Especies de anuros	Especies de bacterias
1	Azuay	Guangarcucho	*Gastrotheca cuencana*	*Pseudomonas chlororaphis*
				Pseudomonas fluorescens
				Serratia marcescens
2	Azuay	Guangarcucho	*Gastrotheca cuencana*	*Pseudomonas fluorescens*
				Pseudomonas jensenii
				Pseudomonas thivervalensis
3	Azuay	Guangarcucho	*Ctenophryne aequatorialis*	*Pseudomonas kilonensis*
4	Azuay	Guangarcucho	*Ctenophryne aequatorialis*	*Pseudomonas fluorescens*
				Pseudomonas jensenii
5	Azuay	Guangarcucho	*Ctenophryne aequatorialis*	*Acinetobacter iwoffii*
				Cryseobacterium joostei
				Pseudomonas kilonensis
6	Azuay	Lazareto	*Gastrotheca cuencana*	*Pseudomonas fluorescens*
				Pseudomonas orientalis
				Pseudomonas thivervalensis
7	Azuay	Lazareto	*Hyloxalus vertebralis*	*Acinetobacter iwoffii*
				Bacillus infantis
				Pseudomonas japonica
				Pseudomonas jensenii
				Staphylococcus xylosus
8	Azuay	Lazareto	*Hyloxalus vertebralis*	*Acinetobacter iwoffii*
				Pseudomonas antarctica
				Pseudomonas thivervalensis
9	Azuay	AMARU	*Epipedobates anthonyi*	*Bacillus siralis*
				Lelliottia amnigena
				Serratia liquefaciens
10	Azuay	AMARU	*Epipedobates anthonyi*	*Pseudomonas japonica*
				Pseudomonas thivervalensis
11	Azuay	AMARU	*Hyloxalus toachi*	*Delftia acidovorans*
				Pseudomonas jensenii
				Pseudomonas thivervalensis
12	Azuay	AMARU	*Hyloxalus toachi*	*Pseudomonas chlororaphis*
				Pseudomonas japonica
				Pseudomonas orientalis
				Pseudomonas thivervalensis
13	Azuay	Chanlud	*Pristimantis erythros*	*Acinetobacter iwoffii*
				Pseudomonas chlororaphis
				Pseudomonas orientalis

14	Azuay	Chanlud	*Pristimantis erythros*	*Acinetobacter iwoffii*
				Pseudomonas chlororaphis
				Pseudomonas fluorescens
				Pseudomonas orientalis
15	Azuay	Chanlud	*Pristimantis lutzae*	*Acinetobacter iwoffii*
				Pseudomonas antarctica
				Pseudomonas fluorescens
				Pseudomonas orientalis
16	Azuay	Chanlud	*Pristimantis lutzae*	*Pseudomonas kilonensis*
17	Azuay	Quimsacocha	*Gastrotheca pseustes*	*Acinetobacter iwoffii*
				Bacillus infantis
				Pseudomonas azotoformans
				Pseudomonas chlororaphis
				Corynebacterium striatum
18	Morona Santiago	Wapú	*Pristimantis conspicillatus*	*Rahnella aquatilis*
19	Morona Santiago	Wapú	*Pristimantis conspicillatus*	*Providencia rettgeri*
				Pseudomonas chlororaphis
				Pseudarthrobacter oxydans
20	Morona Santiago	Wapú	*Chiasmocleis bassleri*	*Kluyvera ascorbata*
				Pseudomonas chlororaphis
21	Morona Santiago	Wapú	*Scinax cruentommus*	*Aeromonas bestiarum*
				Pantoea agglomerans
				Pseudomonas chlororaphis
				Staphylococcus xylosus
22	Morona Santiago	Wapú	*Pristimantis conspicillatus*	*Kluyvera ascorbata*
				Pseudomonas chlororaphis
23	Morona Santiago	Wapú	*Dendropsophus bifurcus*	*Aeromonas bestiarum*
				Pantoea agglomerans
				Pseudomonas chlororaphis
24	Loja	Parque colinar Pucará	*Lithobates catesbeianus*	*Lactobacillus curvatus*
				Pantoea agglomerans
				Pseudomonas antarctica
25	Loja	Parque colinar Pucará	*Lithobates catesbeianus*	*Lactobacillus curvatus*
				Pseudomonas chlororaphis
26	Loja	Abra del Zamora	*Pristimantis versicolor*	*Pseudarthrobacter oxydans*
				Pseudomonas chlororaphis
27	Loja	Abra del Zamora	*Pristimantis balionotus*	*Rahnella aquatilis*
28	Loja	Abra del Zamora	*Pristimantis samaniegoi*	
29	Loja	Abra del Zamora	*Pristimantis colodactylus*	*Pseudomonas antarctica*
				Pseudomonas taetrolens

30	Loja	Abra del Zamora	*Pristimantis matildae*	*Bacillus pumilus* *Lactobacillus jensenii* *Pseudarthrobacter oxydans*
31	Zamora Chinchipe	Límite provincial	*Pristimantis andinognomus*	*Pseudomonas antarctica* *Rahnella aquatilis*
32	Zamora Chinchipe	Límite provincial	*Pristimantis vidua*	
33	Zamora Chinchipe	Criadero - Piuntza	*Lithobates catesbeianus*	*Comamonas testosteroni* *Kluyvera ascorbata* *Pseudomonas chlororaphis* *Pseudomonas rhodesiae*
34	Zamora Chinchipe	Padmi - UNL	*Adenomera hylaedactyla*	*Kluyvera ascorbata* *Pantoea agglomerans* *Pseudarthrobacter oxydans* *Pseudomonas chlororaphis*
35	Zamora Chinchipe	Padmi - UNL	*Pristimantis diadematus*	*Bacillus pumilus* *Pantoea agglomerans* *Proteus mirabilis* *Pseudomonas chlororaphis* *Pseudomonas fluorescens* *Pseudomonas taetrolens*
36	Zamora Chinchipe	Padmi - UNL	*Pristimantis conspicillatus*	*Pseudomonas antarctica* *Pseudomonas orientalis* *Rahnella aquatilis*
37	Cañar	Laguna de Guabizhun	*Hyloxalus vertebralis*	*Bacillus pumilus* *Pseudarthrobacter oxydans*
38	Cañar	Laguna de Guabizhun	*Gastrotheca cuencana*	*Pseudomonas azotoformans* *Pseudomonas brassicacearum* *Pseudomonas extremorientalis* *Pseudomonas rhodesiae*

Fuente: Ron et al, 2021 y Medicult, 2021.

Elaborado por: Romel Riofrío.

Tabla 2: Lista de hongos descritos.

Nro. Muestra	**Provincia**	**Localidad**	**Especies de anuros**	**Especie De bacterias**
2	Azuay	Guangarcucho	*Gastrotheca cuencana*	*Fusarium solani* *Fusarium proliferatum*
3	Azuay	Guangarcucho	*Ctenophryne aequatorialis*	*Aspergillus niger*
4	Azuay	Guangarcucho	*Ctenophryne aequatorialis*	*Syncephalastrum sp.*

6	Azuay	Lazareto	*Gastrotheca cuencana*	*Bipolaris sp.*
8	Azuay	Lazareto	*Hyloxalus vertebralis*	*Hortaea werneckii*
10	Azuay	AMARU	*Epipedobates anthonyi*	*Aspergillus flavus*
11	Azuay	AMARU	*Hyloxalus toachi*	*Hortaea werneckii*
15	Azuay	Chanlud	*Pristimantis lutzae*	*Hortaea werneckii*
17	Azuay	Quimsacocha	*Gastrotheca pseustes*	*Fusarium concentricum* *Hortaea werneckii*
18	Morona Santiago	Wapú	*Pristimantis conspicillatus*	*Hortaea werneckii* *Syncephalastrum sp.*
19	Morona Santiago	Wapú	*Pristimantis conspicillatus*	*Fusarium solani* *Hortaea werneckii* *Syncephalastrum sp.*
20	Morona Santiago	Wapú	*Chiasmocleis bassleri*	*Bipolaris sp.* *Fusarium proliferatum* *Hortaea werneckii*
21	Morona Santiago	Wapú	*Scinax cruentommus*	*Bipolaris sp.*
22	Morona Santiago	Wapú	*Pristimantis conspicillatus*	*Aspergillus niger* *Hortaea werneckii*
23	Morona Santiago	Wapú	*Dendropsophus bifurcus*	*Fusarium solani* *Fusarium proliferatum*
24	Loja	Parque colinar Pucará	*Lithobates catesbeianus*	*Fusarium oxysporum* *Hortaea werneckii* *Syncephalastrum sp.*
25	Loja	Parque colinar Pucará	*Lithobates catesbeianus*	*Fusarium solani*
26	Loja	Abra del Zamora	*Pristimantis versicolor*	*Aspergillus niger* *Fusarium sp.* *Syncephalastrum sp.*
31	Zamora Chinchipe	Límite provincial	*Pristimantis andinognomus*	*Fusarium concentricum*
33	Zamora Chinchipe	Criadero - Piuntza	*Lithobates catesbeianus*	*Fusarium solani*
34	Zamora Chinchipe	Padmi - UNL	*Adenomera hylaedactyla*	*Fusarium solani* *Fusarium proliferatum*
35	Zamora Chinchipe	Padmi - UNL	*Pristimantis diadematus*	*Fusarium solani* *Fusarium oxysporum* *Syncephalastrum sp.*
36	Zamora Chinchipe	Padmi - UNL	*Pristimantis conspicillatus*	*Fusarium proliferatum* *Hortaea werneckii*

37	Cañar	Laguna de Guabizhun	*Hyloxalus vertebralis*	*Fusarium concentricum* *Fusarium proliferatum*

Fuente: Ron et al, 2021 y Medicult, 2021.

Tabla 3. Ubicación de las muestras de anuros.

Nro. de Muestra	Especie	Provincia	Localidad	Coordenadas geográficas	Altura	Hábitat
1	*Gastrotheca cuencana*	Azuay	Guangarcucho	-2,843274 -78,885605	2545	Natural
2	*Gastrotheca cuencana*	Azuay	Guangarcucho	-2,843274 -78,885605	2545	Natural
3	*Ctenophryne aequatorialis*	Azuay	Guangarcucho	-2,843274 -78,885605	2545	Natural
4	*Ctenophryne aequatorialis*	Azuay	Guangarcucho	-2,843274 -78,885605	2545	Natural
5	*Ctenophryne aequatorialis*	Azuay	Guangarcucho	-2,843274 -78,885605	2545	Natural
6	*Gastrotheca cuencana*	Azuay	Lazareto	-2,882491 -79,008925	2608	Natural
7	*Hyloxalus vertebralis*	Azuay	Lazareto	-2,882491 -79,008925	2608	Natural
8	*Hyloxalus vertebralis*	Azuay	Lazareto	-2,882491 -79,008925	2608	Natural
9	*Epipedobates anthonyi*	Azuay	AMARU	-2,895228 -78,957036	2603	Zoocriadero
10	*Epipedobates anthonyi*	Azuay	AMARU	-2,895228 -78,957036	2603	Zoocriadero
11	*Hyloxalus toachi*	Azuay	AMARU	-2,895228 -78,957036	2603	Zoocriadero
12	*Hyloxalus toachi*	Azuay	AMARU	-2,895228 -78,957036	2603	Zoocriadero
13	*Pristimantis erythros*	Azuay	Chanlud	-2,682961 -79,033192	3477	Natural
14	*Pristimantis erythros*	Azuay	Chanlud	-2,682961 -79,033192	3477	Natural
15	*Pristimantis lutzae*	Azuay	Chanlud	-2,682961 -79,033192	3477	Natural
16	*Pristimantis lutzae*	Azuay	Chanlud	-2,682961 -79,033192	3477	Natural
17	*Gastrotheca pseustes*	Azuay	Quimsacocha	-3,034273 -79,222145	3575	Natural

18	*Pristimantis conspicillatus*	Morona Santiago	Wapú	-2,150607 -78,075318	1232	Natural
19	*Pristimantis conspicillatus*	Morona Santiago	Wapú	-2,150607 -78,075318	1232	Natural
20	*Chiasmocleis bassleri*	Morona Santiago	Wapú	-2,150607 -78,075318	1232	Natural
21	*Scinax cruentommus*	Morona Santiago	Wapú	-2,150607 -78,075318	1232	Natural
22	*Pristimantis conspicillatus*	Morona Santiago	Wapú	-2,164194 -78,078428	1214	Natural
23	*Dendropsophus bifurcus*	Morona Santiago	Wapú	-2,164592 -78,079509	1208	Natural
24	*Lithobates catesbeianus*	Loja	Parque colinar Pucará	-4,012724 -79,195073	2191	Natural
25	*Lithobates catesbeianus*	Loja	Parque colinar Pucará	-4,012724 -79,195073	2191	Natural
26	*Pristimantis versicolor*	Loja	Abra del Zamora	-3,985234 -79,145307	2821	Natural
27	*Pristimantis balionotus*	Loja	Abra del Zamora	-3,985234 -79,145307	2821	Natural
28	*Pristimantis samaniegoi*	Loja	Abra del Zamora	-3,985234 -79,145307	2821	Natural
29	*Pristimantis colodactylus*	Loja	Abra del Zamora	-3,985234 -79,145307	2821	Natural
30	*Pristimantis matildae*	Loja	Abra del Zamora	-3,985234 -79,145307	2821	Natural
31	*Pristimantis andinognomus*	Zamora Chinchipe	Límite provincial	-3,992947 -79,145022	2822	Natural
32	*Pristimantis vidua*	Zamora Chinchipe	Límite provincial	-3,992947 -79,145022	2822	Natural
33	*Lithobates catesbeianus*	Zamora Chinchipe	Criadero - Piuntza	-3,870451 -78,881814	866	Criadero
34	*Adenomera hylaedactyla*	Zamora Chinchipe	Padmi - UNL	-3,737577 -78,619146	892	Natural
35	*Pristimantis diadematus*	Zamora Chinchipe	Padmi - UNL	-3,737577 -78,619146	892	Natural
36	*Pristimantis conspicillatus*	Zamora Chinchipe	Padmi - UNL	-3,737577 -78,619146	892	Natural
37	*Hyloxalus vertebralis*	Cañar	Laguna de Guabizhun	-2,803048 -78,936164	2658	Natural
38	*Gastrotheca cuencana*	Cañar	Laguna de Guabizhun	-2,803048 -78,936164	2658	Natural

Fuente: Ron et al, 2021.