

IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS ASOCIADAS A LA PIEL DE LAS RANAS DEL HUMEDAL DE LA CIUDAD DE BENJAMÍN ACEVAL, PARAGUAY, A PARTIR DE MÉTODOS BACTERIOLÓGICOS Y EL MÉTODO AUTOMATIZADO VITEK®

IDENTIFICATION OF BACTERIA ASSOCIATED WITH THE SKIN OF FROGS FROM BENJAMÍN ACEVAL CITY WETLAND, PARAGUAY, USING BACTERIOLOGICAL METHODS AND THE AUTOMATED VITEK®

Jose Petters^{1,2,3*}, Mirian Alonso², Laura Ibarrola² & Teresa Sotelo²

¹Itaipu Binacional, MD, Ciudad del Este, Paraguay.

²Servicio Nacional de Calidad y Salud Animal-SENACSA-Paraguay, Asunción, Paraguay.

³Universidad San Carlos, Asunción, Paraguay.

*Correspondence: gaspapy@hotmail.com

Received: 2024-03-13. Accepted: 2024-06-19. Published: 2024-08-30.

Editor: Pier Cacciali, Paraguay.

Abstract.— Altered ecological interactions between mutualistic microbes and hosts can lead to diseases, but understanding the interactions between the host, disease-causing microbes, and environment can contribute to strategies for disease prevention. The main objective of this work is to identify the microbial flora accompanying the skin of amphibians from the city of Benjamín Aceval, from skin swabs and microbiological, automated and biochemical techniques. A total of 40 skin swabs were collected corresponding to seven different species of amphibians. The results demonstrated the presence of the bacteria *Aeromana hydrophila/punctata* (caviae), *Enterobacter cloacae* complex, *Citrobacter freundii*, *Vibrio vulnificus*, *Ochractrum antropi*, *Serratia fonticola*, *S. liquefaciens*, and *Klebsiella oxytoca*. This work demonstrates the importance of analyzing and monitoring of free-living amphibians to avoid possible mass mortality crises and generate future management plans.

Keywords.— Anurans, culture, microbiology.

Resumen.— Las interacciones ecológicas alteradas entre los microbios mutualistas y los huéspedes pueden provocar enfermedades, pero la comprensión de las interacciones entre el huésped, los microbios y ambiente causantes de enfermedades puede contribuir a estrategias para la prevención de enfermedades. El objetivo principal de este trabajo es identificar la flora microbiana acompañante de la piel de los anfibios de la ciudad de Benjamín Aceval, a partir de hisopados de piel y técnicas microbiológicas, automatizadas y bioquímicas. Se colectaron un total de 40 hisopados de piel correspondientes a siete especies distintas de anfibios. Los resultados demostraron la presencia las bacterias *Aeromana hydrophila/punctata* (caviae), *Enterobacter cloacae* complex, *Citrobacter freundii*, *Vibrio vulnificus*, *Ochractrum antropi*, *Serratia fonticola*, *S. liquefaciens* y *Klebsiella oxytoca*. Este trabajo demuestra la importancia de los análisis y monitoreo de los anfibios en vida libre para evitar posibles crisis de mortandades masivas y generar planes de manejo a futuro.

Palabras clave.— Anuros, cultivo, microbiología.

INTRODUCCIÓN

Los anfibios han adquirido gran importancia en los últimos tiempos, no solo debido a su rol en el equilibrio del ecosistema, sino como controladores naturales de determinados insectos y otros artrópodos que pueden resultar incluso nocivos para la salud pública, y también servir como biomasa dentro de la pirámide trófica, sino también, por los rasgos ecológicos y

filogenéticos que los hacen aún más interesantes a la hora de estudiarlos. Además, son considerados buenos indicadores de salud ambiental, dada la sensibilidad de sus fases larvarias a los contaminantes del agua y a que pasan la mayor parte de su vida en relación con el agua (Simons et al., 1997; Diaz Paez & Ortiz, 2003).

La piel de los anfibios alberga una microbiota bastante diversa y muchos de estos organismos pueden resultar beneficiosos por formar parte del sistema inmune adquirido (defensa cutánea), o por poseer actividad antimicrobiana y antifúngica contra otros determinados agentes que pueden presentarse en la piel pero resultar perjudiciales para el hospedero, incluido el quitridio *Batrachochytrium dendrobatidis* y otros patógenos potenciales, y que estos agentes pueden ser controlados de forma natural por otros microorganismos presentes en la piel de los anfibios, pero cuando las condiciones ambientales no son las óptimas, estos que resultaban beneficiosos podrían volverse patógenos y potenciar la virulencia de los demás agentes (Woodhams et al., 2007; Flechas et al., 2012).

Existen varios métodos que permiten identificar la presencia de bacterias a través de medios de cultivo nutritivos, medios diferenciales y selectivos que ayudan a la búsqueda del cultivo puro (Webb, 2010). El VITEK® que es un dispositivo automatizado que realiza la identificación y caracterizados de las bacterias por medio de espectrometría que utiliza la tecnología de desorción/ionización láser asistida por matriz - Tiempo de vuelo (MALDI-TOF) (Jordá Vargas et al., 2005). El método de Enterosystem es una prueba práctica y fácil de realizar, que se basa en la identificación de las colonias a partir de 24 pruebas bioquímicas en un panel de pocillos enfocado principalmente en Enterobacteriaceae gramnegativas y oxidasas negativas (Johnson & Wellehan, 2005).

Existen varios agentes bacterianos que pueden encontrarse en la piel de los anfibios, estos pueden resultar tanto beneficiosos como perjudiciales y tornarse patógenos. La comprensión de las asociaciones existentes en la piel es importante para poder determinar cuáles son los factores que pueden desencadenar las distintas enfermedades y poner en riesgo la salud de las poblaciones o comunidades de anfibios en determinados biomas. El objetivo de este trabajo es identificar la composición bacteriana de la piel de los anfibios en la ciudad de Benjamín Aceval, Departamento de Presidente Hayes, Paraguay, a partir de cultivos bacterianos, pruebas bioquímicas y automatizadas con la máquina VITEK®

MATERIAL Y MÉTODOS

Area de estudio

Se encuentra demarcada en los humedales periurbanos de ciudad de Benjamín Aceval, Departamento de Presidente Hayes (Fig. 1), iniciándose en las coordenadas (24° 59' 51" S y 57° 32' 29" W), en el que se trazó un polígono, de ~5 km de perímetro y un área de 1.5 km², en donde se muestreó un humedal localizado a unos 200 m del casco urbano, el mismo presentaba un cuerpo de agua principal de una dimensión aproximada de 400 m de largo por 170 m de ancho, continuado de una porción pantanosa, característicos los bosques fluviales y las áreas deprimidas con alta cobertura de vegetación flotante libre, embalsados y camalotales, así como también, juncales y totorales, con una predominancia de sabanas con palmera caranday, también se puede denotar la presencia de animales domésticos en el área de estudios, principalmente bovinos y gallinas, (Mereles et al., 2015). El estudio de campo se llevó a cabo durante los días 10 y 14 de mayo de 2023 y el trabajo de laboratorio se extendió hasta junio del mismo año.

Colecta de datos.

Para la colecta de los individuos se contó con el permiso de colecta del Ministerio del Ambiente y Desarrollo Sostenible (MADES N° 006/2023). Se capturó la mayor cantidad posible de anfibios, durante las últimas horas luz de sol del día y abarcando un poco la entrada de la noche, siguiendo el protocolo de Pereyra et al. (2021) para búsqueda activa y captura.

Se realizaron frotis cutáneos, realizando 5 a 10 pasadas con hisopos estériles de algodón, en la región ventral, inguinal y plantar, como se observa en la Figura 2. Los hisopos se introdujeron en tubos de ensayo de 10 ml con medio TGHl caldo y se realizaron siembras *in situ* en placas de Petri con el medio gel TGHl (Ramírez-Castro, 2010; OIE, 2021), para posteriormente utilizar las muestras sembradas en las placas de petri y dejar las muestras sembradas en el caldo como duplicados.

Cada ejemplar fue medido y pesado, teniendo en cuenta las medidas del hocico a la cloaca, utilizando un calibre y balanzas digitales, para luego realizar un promedio de las medidas por especie. Las especies fueron identificadas con base en Weiler et al. (2013) y la taxonomía sigue a Frost (2023). Posteriormente al hisopado, la medición de los individuos, y su identificación, estos fueron liberados en el mismo sitio de captura. Las muestras fueron trasladadas hasta el laboratorio de microbiología del Servicio Nacional de Calidad y Salud Animal (SENACSA).

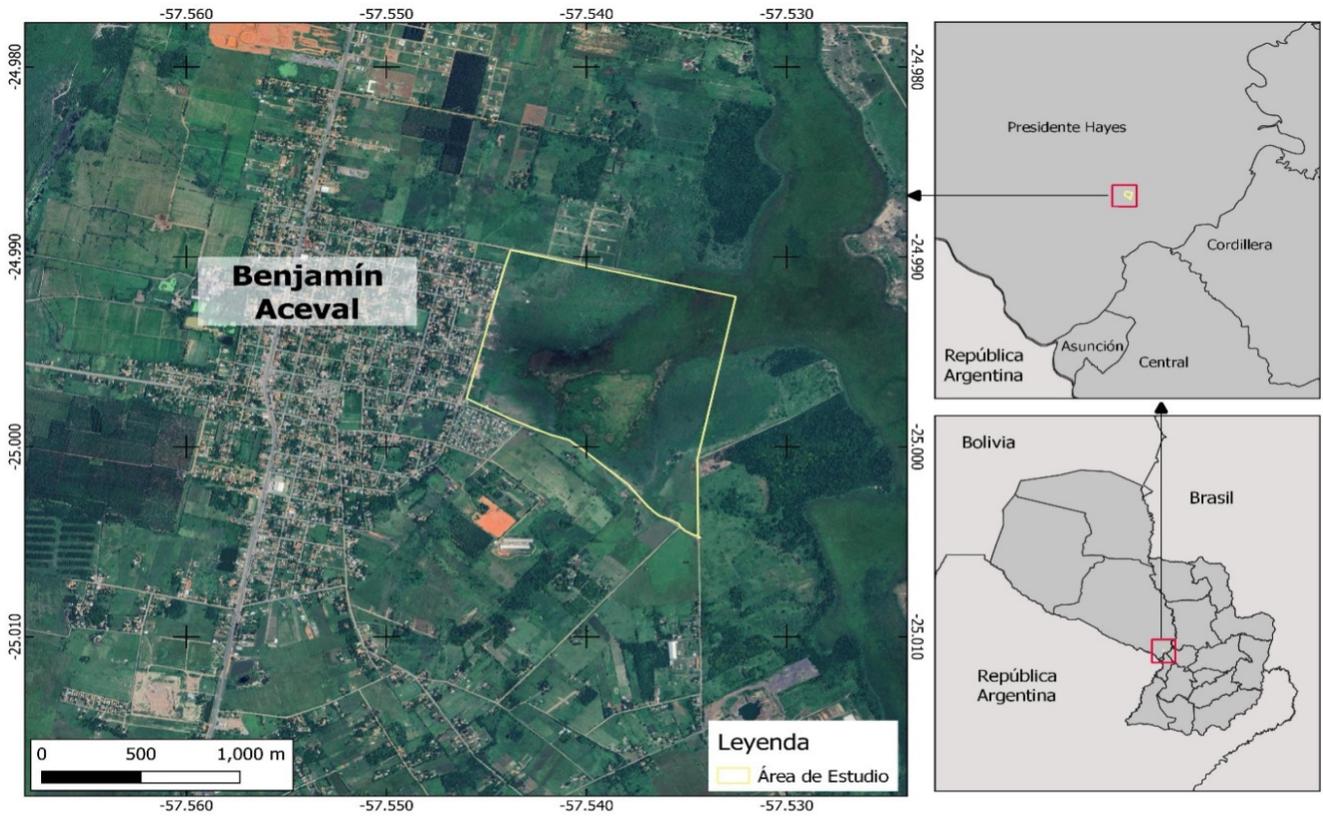


Figure 1. Polygon delimiting the study area for sample collection, located in the peri-urban wetland of the city of Benjamin Aceval.

Figura 1. Polígono delimitando el área de estudio para colecta de muestras, ubicado en el humedal periurbano de la ciudad de Benjamin Aceval.



Figure 2. Swab of captured individuals. / Figura 2. Hisopado de los individuos capturados.

Análisis de laboratorio

Las muestras se incubaron a una temperatura de entre 17 y 23 °C y se realizaron observaciones diarias de los crecimientos presentados en las placas. La manipulación de las colonias se realizó en un entorno estéril a fin de evitar contaminantes ambientales, utilizando cabinas de flujo laminar y materiales estériles.

Las colonias de bacterias provenientes de las placas de Petri fueron repicadas a modo de obtener colonias puras y jóvenes, para realizar una identificación bioquímica por el método de Enterosystem y también fueron caracterizadas morfológicamente (Johnson & Wellehan, 2005). Los repiques fueron realizados en Placas de Agar Mac Conkey y TSA, a modo de tener crecimientos más puros y aislados, y fueron procesadas en el VITEK® y por la técnica Bioquímica Enterosystem, mientras que las colonias sembradas en los medios caldo se guardaron a modo de duplicados.

RESULTADOS

Durante la primera campaña de colecta (10 de mayo de 2023) se capturaron 25 individuos, 10 correspondientes a la especie *Lysapsus limellum* (Fig. 3 a), 10 de *Boana punctata* (Fig. 3 b), dos de *Leptodactylus luctator* (Fig. 3 c), dos de *Dendropsophus nanus* y una

de *Leptodactylus podicipinus*. En la segunda campaña (14 de mayo de 2023) se colectaron 15 individuos, ocho de *Lysapsus limellum*, tres de *Pseudopaludicola boliviana* (Fig. 3 d), una de *Leptodactylus luctator*, una de *Dendropsophus nanus*, una de *Boana punctata* y una de *Boana raniceps* (Fig. 3 e).

Todos los individuos se encontraron en reposo o vocalizando, dentro del cuerpo de agua explorado, con algunas excepciones en las que los ejemplares se encontraban en áreas más alejadas. Ninguno de los animales capturados presentaba síntomas de afecciones o lesiones que pueda llamar la atención

Los pesos y dimensiones del hocico a la cloaca en promedio fueron los siguientes: 18 individuos de *Lysapsus limellum* cuya longitud hocico cloaca es 0.59 ± 0.10 (0.42 - 0.80) y cuya masa corporal es 16.79 ± 2.76 (06.93 - 20.01); 11 individuos de *Boana punctata*, cuya longitud hocico cloaca es 1.91 ± 0.27 (1.59 - 2.27) y cuya masa corporal es 29.60 ± 1.85 (26.13 - 31.58); tres individuos de *Dendropsophus nanus*, cuya longitud hocico cloaca es 0.23 ± 0.14 (0.10 - 0.38) y cuya masa corporal es 15.09 ± 2.69 (12.71 - 17.43); tres individuos de *Pseudopaludicola boliviana*, cuya longitud hocico cloaca es 0.23 ± 0.06 (0.20 - 0.30) y cuya masa corporal es 12.85 ± 1.70 (10.96 - 14.26); tres individuos de *Leptodactylus luctator*, cuya longitud hocico cloaca es 49.33 ± 17.62 (29.00 - 60.00) y cuya masa corporal es 83.02 ± 24.31 (56.15 - 103.48); como *Leptodactylus*

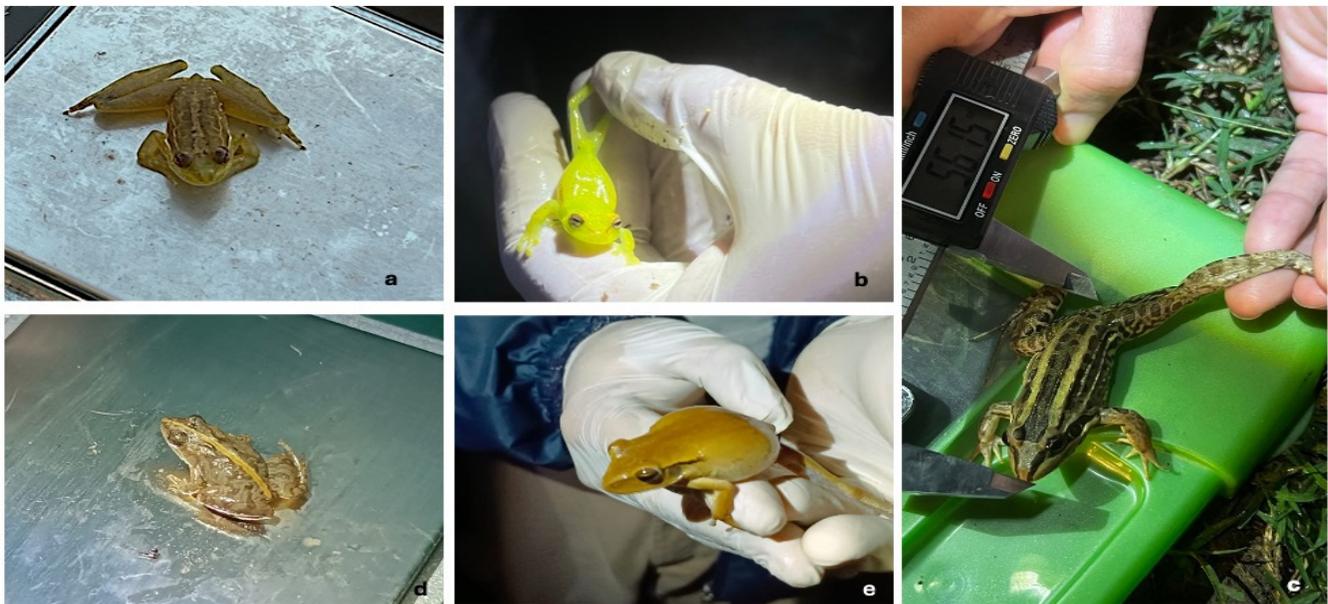


Figure 3. Species captured and sampled, swabs in media: a. *Lysapsus limellum*; b. *Boana punctata*; c. *Leptodactylus luctator*; d. *Pseudopaludicola boliviana*; e. *Boana raniceps*.

Figura 3. Especies capturadas y muestreadas, hisopados en medios: a. *Lysapsus limellum*; b. *Boana punctata*; c. *Leptodactylus luctator*; d. *Pseudopaludicola boliviana*; e. *Boana raniceps*.

podicipinum y *Boana raniceps* solo presentaron un individuo respectivamente, no se realizaron las caracterizaciones (Tabla 1).

Del total de las placas, 13 presentaron colonias bacterianas que presentaban características típicas como Colonias rosadas, blancas, amarillas y/o cremosas, las cuales fueron repicadas en Agar MacConkey y TSA (Fig. 4), para aislarlas del resto de las colonias y obtener colonias más puras, para realizarles las

pruebas de VITEK® y también por el método de Enterosystem en pocillos para identificar Enterobacteriaceae gramnegativas y oxidasas negativas (Tabla 1).

En cuanto a los resultados microbiológicos para detectar las bacterias presentes en los cultivos a partir del VITEK® se obtuvieron los siguientes resultados: Tres placas con crecimiento de *Aeromana hydrophila/punctata* (caviae), tres con *Enterobacter*

Table 1. Results of microbiological tests for detection of bacteria and measurements taken.

Tabla 1. Resultados de las pruebas microbiológicas para detección de bacterias y medidas tomadas.

No. de muestra	Especie	Peso (gr)	Longitud hocico-cloaca (cm)	Resultado para colonia bacteriana	Resultado VITEK®	Resultado Enterosystem
1	<i>Lysapsus limellum</i>	0.42	15.22	No se observan colonias sospechosas	-	-
2	<i>L. limellum</i>	0.53	16.33	Colonia cremosa	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Sin resultados
3	<i>L. limellum</i>	0.67	20.01	No se observan colonias sospechosas	-	-
4	<i>L. limellum</i>	0.76	19.51	No se observan colonias sospechosas	-	-
5	<i>L. limellum</i>	0.52	16.67	Colonia blanca	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	<i>Enterobacter cloacae</i> complex
6	<i>L. limellum</i>	0.61	16.02	Colonia amarilla	<i>Serratia liquefaciens</i>	<i>Enterobacter cloacae</i> complex
7	<i>L. limellum</i>	0.51	16.25	No se observan colonias sospechosas	-	-
8	<i>L. limellum</i>	0.58	18.58	Colonia blanca	<i>Aeromana hydrophila/punctata</i> (caviae)	<i>Citrobacter freundii</i>
9	<i>L. limellum</i>	0.67	17.67	Colonia amarilla y colonia cremosa	<i>Aeromana hydrophila/punctata</i> (caviae)	Sin resultados
10	<i>L. limellum</i>	0.51	16.93	No se observan colonias sospechosas	-	-
11	<i>Boana punctata</i>	2.24	31.58	No se observan colonias sospechosas	-	-
12	<i>B. punctata</i>	1.66	26.13	Colonia amarilla	Sin resultados	<i>Enterobacter cloacae</i> complex
13	<i>B. punctata</i>	1.8	30.79	Colonia amarilla	<i>Serratia fonticola</i>	Sin resultados
14	<i>B. punctata</i>	2.02	28.91	No se observan colonias sospechosas	-	-
15	<i>B. punctata</i>	1.99	29.31	No se observan colonias sospechosas	-	-
16	<i>B. punctata</i>	1.59	26.46	Colonia cremosa	<i>Vibrio vulnificus</i>	Sin resultados
17	<i>B. punctata</i>	2.01	31.02	No se observan colonias sospechosas	-	-
18	<i>B. punctata</i>	2.27	30.52	Colonia pequeña	Sin resultados	<i>Enterobacter cloacae</i>



Table 1 (Continuation). Results of microbiological tests for detection of bacteria and measurements taken.**Tabla 1 (Continuación).** Resultados de las pruebas microbiológicas para detección de bacterias y medidas tomadas.

No. de muestra	Especie	Peso (gr)	Longitud hocico-cloaca (cm)	Resultado para colonia bacteriana	Resultado VITEK®	Resultado Enterosystem
19	<i>B. punctata</i>	2.21	29.83	No se observan colonias sospechosas	-	-
20	<i>Boana punctata</i>	1.59	29.51	No se observan colonias sospechosas	-	-
21	<i>Leptodactylus luctator</i>	29	56.15	No se observan colonias sospechosas	-	-
22	<i>L. luctator</i>	59	89.44	No se observan colonias sospechosas	-	-
23	<i>Leptodactylus podicipinus</i>	6	41.42	No se observan colonias sospechosas	-	-
24	<i>Dendropsophus nanus</i>	0.38	17.46	No se observan colonias sospechosas	-	-
25	<i>D. nanus</i>	0.22	15.65	No se observan colonias sospechosas	-	-
26	<i>Lysapsus limellum</i>	0.8	17.52	No se observan colonias sospechosas	-	-
27	<i>L. limellum</i>	0.5	6.93	Colonia cremosa	<i>Ochrobactrum antropi</i>	Sin resultados
28	<i>L. limellum</i>	0.6	17.35	No se observan colonias sospechosas	-	-
29	<i>L. limellum</i>	0.6	17.25	No se observan colonias sospechosas	-	-
30	<i>L. limellum</i>	0.6	17.24	Colonia amarilla	Sin resultados-	<i>Citrobacter freundii</i>
31	<i>L. limellum</i>	0.6	17.28	No se observan colonias sospechosas	-	-
32	<i>L. limellum</i>	0.2	10.96	No se observan colonias sospechosas	-	-
33	<i>Pseudopaludicola boliviana</i>	0.5	16.22	Colonia amarilla	<i>Vibrio vulnificus</i>	Sin resultados
34	<i>P. boliviana</i>	0.2	13.33	Colonia amarilla y colonia cremosa	<i>Aeromana hydrophila/punctata (caviae)</i>	Sin resultados
35	<i>P. boliviana</i>	0.7	19.15	No se observan colonias sospechosas	-	-
36	<i>P. boliviana</i>	0.3	68.76	No se observan colonias sospechosas	-	-
37	<i>Boana raniceps</i>	4	68.76	No se observan colonias sospechosas	-	-
38	<i>B. punctata</i>	1.6	31.52	No se observan colonias sospechosas	-	-
39	<i>D. nanus</i>	0.1	12.17	No se observan colonias sospechosas	-	-
40	<i>L. luctator</i>	60	103.48	No se observan colonias sospechosas	-	-



Figure 4. Cultivation of colonies on MacConkey Agar and TSA.

Figura 4. Cultivo de colonias en Agar MacConkey y TSA.

cloacae complex, dos con *Citrobacter freundii*, dos *Vibrio vulnificus*, las demás especies se presentaron en solo una placa: *Ochractrum antropi*, *Serratia fonticola*, *S. liquefaciens* y *Klebsiella oxytoca*, presentándose un total de ocho especies distintas de bacterias (Tabla 1).

DISCUSIÓN

Como ya se mencionó anteriormente las características de la piel de los anfibios proporciona un medio de cultivo ideal para la proliferación de bacterias, tanto beneficiosas como patógenas. Martin et al. (2019) reportan que existe una mayor tendencia en la presencia de las bacterias Gram negativas que las bacterias Gram positivas. Muchos microorganismos patógenos han sido aislados de anfibios y reptiles en cautiverio, por citar algunas: *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila*, *Providencia rettgeri*, *Morganella morganii*, *Salmonella arizonae* y *Klebsiella oxytoca*, los que, según el estado del huésped y el ambiente, pueden desarrollar las distintas patologías o servir de sinergia para otros agentes invasores (Kiesecker & Blaustein, 1995; Bosch, 2003; Lauer et al., 2008).

Del total de las especies de bacterias identificadas en este estudio, todas han sido citadas al menos alguna vez en reportes de flora microbiana en piel de anfibios, en mayor proporción tenemos a *Aeromana hydrophila/punctata* (caviae) y *Citrobacter freundii*, las que fueron dominantes en este estudio, y aunque *Enterobacter cloacae* se ha informado en las entrañas de las ranas (Chang et al., 2016), también su presencia se reportó en piel de sapos del género *Bombina* y en las ranas del género *Eleutherodactylus* (Bataille et al., 2016; Hughey et al., 2017). Las enterobacterias se pueden encontrar en diversos ambientes (suelo, agua, tracto digestivo de animales), por lo que las ranas podrían entrar en contacto con ellas desde los desagües y cuerpos de agua (Neave et al., 2014) o a través de los invertebrados que han consumido (Chang et al., 2016). La bacteria *Aeromonas hydrophila* es un microbio anaerobio gramnegativo que puede vivir en ambientes variados, tanto de agua dulce como salobre con un gran rango de temperatura de 4 a 37 °C (Hazen et al., 1978). Este microorganismo ha sido identificado en todos los continentes y resulta virulento para múltiples clases de vertebrados, incluidos los anfibios (Marquez et al., 1995), causa enfermedad denominada “pata roja” y ha estado implicado en la muerte de anuros (Emerson & Norris 1905). La enfermedad se caracteriza

por la presencia de eritema cutáneo con otros signos clínicos que incluyen anorexia, edema, úlceras, descamación o necrosis (Densmore & Green, 2007), pero ninguno de estos síntomas fue observado en las ranas de este estudio. Se cree que *A. hydrophila* contribuye o incluso causa algunos eventos de mortalidad de anfibios atribuidos a *B. dendrobatidis* y se ha sugerido que es parte de la flora normal de los anuros y puede estar presente en animales no enfermos (Miller et al. 2009). Por otro lado, Rivas (2016), no encontró relación entre *B. dendrobatidis* y *A. hydrophila*, y que la presencia de esta última se confirma post mortem.

Se han aislado varias especies bacterianas gramnegativas oportunistas, tales como *Aeromonas hydrophila*, *Chryseobacterium indologenes*, *C. meningosepticum*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Serratia liquefaciens*, en ranas enfermas de la especie *Xenopus laevis* (Schadich, 2009), varias de las cuales fueron reportadas en este estudio, como *Aeromonas hydrophila*, *Citrobacter freundii*, y *Serratia liquefaciens*. Estas especies bacterianas se pueden encontrar entre la microbiota de la piel y el intestino de ranas sanas, pero también se sabe que causan enfermedades (Hird et al., 1989; Pearson, 1998). El desarrollo de la enfermedad depende de la virulencia del organismo, factores ambientales, estrés, factores dietéticos, salud y estado inmunológico del animal (Olson et al., 1992; Hayes et al., 2006).

La bacteria *V. vulnificus*, un bacilo halófilo gramnegativo, se encuentra en el agua, sedimentos, plancton y mariscos como ostras, almejas y cangrejos. En los últimos años han aumentado los reportes de enfermedades necrosantes en seres humanos causadas por *V. vulnificus* (Huang et al., 2016). Sin embargo, no se han encontrado reportes de esta bacteria en ranas vivas en cautividad o en estado silvestres, por lo que este trabajo podría evidenciar la presencia de esta en piel de anfibios silvestres, y alertar de la importancia del estudio de este patógeno en anfibios, considerando el potencial zoonótico que pueden presentar.

Otro reporte importante es la presencia de *Ochrobactrum anthropi*, en una de las muestras procesadas, no se conoce mucho sobre este organismo y su potencial patógeno en anfibios, pero se sabe que *Ochrobactrum* spp. son organismos ambientales y se consideran patógenos oportunistas de baja virulencia en humanos (Wisplinghoff, 2017). Mientras que Eisenberg et al. (2012) sugieren que *Ochrobactrum anthropi*, muestra un 100 % de identidad con *Brucella inopinata* evidenciado por la secuencia del ARNr 16S.

CONCLUSIONES

Este trabajo demuestra la importancia del monitoreo sanitario de las especies silvestres, de tal forma a tener un paneo de la situación actual de poblaciones. Se presenta el primer reporte de *Aeromonas hydrophila*, en anfibios para el Paraguay, otro reporte, es la presencia de *Vibrio vulnificus* en anfibios, éste podría considerarse el primer reporte de la presencia de esta bacteria en una comunidad de anfibios silvestres.

El equipo automatizado VITEK® ha demostrado ser una buena herramienta para complementar la identificación de la comunidad de bacterias en la piel de anfibios, el cual puede ser enriquecido aun más si se incluyen otros metodos complementarios como las pruebas bioquimicos.

Agradecimientos.— Especial agradecimiento al Servicio Nacional de Calidad y Salud Animal, al Presidente y los respectivos directores que consedieron el permiso de realizacion del ensayo en las instalaciones de la Direccion General de Laboratorios, Direccion de Diagnostico y Control de Productos Veterinarios, al Ministerio del Ambiente y Desarrollo Sostenible por el permiso de colecta de muestras otorgado y a la Lic. Yanine Maubet y la MSc. Karina Nuñez y a todas las personas que hicieron posible la realización de esta investigación, tanto en la colecta como en la realización de los respectivos análisis.

LITERATURA CITADA

- Bataille, A., L. Lee-Cruz, B. Tripathi, H. Kim & B. Waldman. 2016. Microbiome variation across amphibian skin regions: implications for chytridiomycosis mitigation efforts. *Microbial Ecology* 71:221-232.
- Bosch, J. 2003. Nuevas amenazas para los anfibios: enfermedades emergentes. *Munibe* 51:56-73.
- Chang, C.W., B.H. Huang, S.M. Lin, C.L. Huang & P.C. Liao. 2016. Changes of diet and dominant intestinal microbes in farmland frogs. *BMC microbiology* 16:33.
- Densmore, C.L. & D.E. Green. 2007. Diseases of Amphibians. *ILAR Journal* 48:235-254.
- Díaz Páez, H. & J.C. Ortiz. 2003. Evaluación del Estado de Conservación de los Anfibios de Chile. *Revista Chilena de Historia Natural* 76: 509-525.



- Eisenberg, T., H.P. Hamann, U. Kaim, K. Schlez, H. Seeger, N. Schauerte, F. Melzer, H. Tomaso, H.C. Scholz, M. Koylass, A.M. Whatmore & M. Zschöck. 2012. Isolation of potentially novel *Brucella* spp. from frogs. *Applied and environmental microbiology* 78: 3753-3755.
- Emerson, H. & C. Norris. 1905. Red-Leg--An Infectious Disease of Frogs. *Journal of Experimental Medicine* 7.1:32-58.
- Flechas S. V., C. Sarmiento, M.E. Cárdenas, E.M. Medina, S. Restrepo & A. Amézquita A. 2012. Surviving chytridiomycosis: differential anti-*Batrachochytrium dendrobatidis* activity in bacterial isolates from three lowland species of *Atelopus*. *PLoS ONE* 7:e44832.
- Frost, D. 2023. Amphibian Species of the World: An Online Reference. <https://amphibiansoftheworld.amnh.org> [Consultado en noviembre 2023]
- Hayes T.B., P. Case, S. Chui D. Chung C. Haeffele, K. Haston, M. Lee, V.P. Mai, Y. Marjua, J. Parker & M. Tsui. 2006. Pesticide mixtures, endocrine disruption, and amphibian declines: are we underestimating the impact? *Environ Health Perspect* 114:40-50.
- Hazen, T., C. Flierman, R. Hirsch, & G. Esch. 1978. Prevalence and Distribution of *Aeromonas hydrophila* in the United States." *Applied and Environmental Microbiology* 36.5: 731-38.
- Hird D.W., S.L. Diesch, R.G. McKinnell, E. Gorham, F.B. Martin, S.W. Kurtz & C. Dubrovoly. 1981. *Aeromonas hydrophila* in wild-caught frogs and tadpoles (*Rana pipiens*) in Minnesota. *Laboratory Animal Science* 31:166-169.
- Huang, K.C., H.H. Weng, T.Y. Yang, T.S. Chang, T.W. Huang & M.S. Lee. 2016. Distribution of Fatal *Vibrio vulnificus* Necrotizing Skin and Soft-Tissue Infections: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Medicine* 95:e2627.
- Hughey, M.C., J.A. Pena, R. Reyes, D. Medina, L.K. Belden & P.A. Burrowes. 2017. Skin bacterial microbiome of a generalist Puerto Rican frog varies along elevation and land use gradients. *PeerJ* 5: e3688.
- Johnson, A. & J. Wellehan. 2005. Amphibian virology. *Veterinary Clin. Exot of Northamerica. Exotic Animal Practice* 8:53-65.
- Jordá Vargas L., A. Vila, A. Lanza, P. Bonvehi, J. Nazar, A. Mikietuk, R. Labat & J. Smayevsky. 2005. Utilidad del sistema VITEK en la identificación bacteriana y estudios de sensibilidad antimicrobiana. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* 39:19-25.
- Kiesecker, J.M. & A.R. Blaustein. 1995. Synergism between UV-B radiation and a pathogen magnifies amphibian mortality in nature. *Proceedings of the National Academy of Science* 92:11049-11052.
- Lauer A, M.A. Simon, J.L. Banning, E. André, K. Duncan & R.N. Harris R.N. 2007. Common cutaneous bacteria from the eastern red-backed salamander can inhibit pathogenic fungi. *Copeia* 2007: 630-640.
- Marquez, R., J. Olmo & J. Bosch. 1995. Recurrent mass mortality of larval midwife toads *Alytes obstetricans* in a lake in the Pyrenean Mountains. *Herpetological Journal* 5:287-289.
- Martin H.C., R. Ibáñez & L.F. Nothias. 2019. Viscosin-like lipopeptides from frog skin bacteria inhibit *Aspergillus fumigatus* and *Batrachochytrium dendrobatidis* detected by imaging mass spectrometry and molecular networking. *Science Reports* 9:3019.
- Mereles F.M., J. De Egea, G. Elsam, M.C. Céspedes, R. Peña-Chocarro & D. Arrúa. 2015. Plantas acuáticas y palustres del Paraguay. *Rojasiana (San Lorenzo)* 2: 236.
- Miller, D. L., M.J. Gray, S. Rajeev, A.C. Schmutzer, E.C. Burton, A. Merrill & C.A. Baldwin. 2009. Pathologic findings in larval and juvenile anurans inhabiting farm ponds In Tennessee, USA. *Journal of Wildlife Diseases* 45.2: 314-24.
- Neave, M., H. Luter, A. Padovan, S. Townsend, X. Schobben & K. Gibb. 2014. Multiple approaches to microbial source tracking in tropical northern Australia. *MicrobiologyOpen* 3:860-874.
- OIE. 2020. Infección por *Batrachochytrium dendrobatidis*. Capítulo 2.1.1. PP 1-23. En *Manual de pruebas de diagnóstico para los animales acuáticos*. Paris. Francia.
- Olson M.E., S. Gard, M. Brown, R. Hampton & D.W. Morck. 1992. *Flavobacterium indologenes* infection in leopard frogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 201: 1766-1770.
- Pearson MD. 1998. Motile *Aeromonas* septicaemia of farmed *Rana* spp. PhD. Thesis. University of Stirling. Stirling, UK.
- Pereyra, L., E. Etchepare & M. Vaira. 2021. *Manual de Técnicas y Protocolos para el Relevamiento y Estudio de Anfibios de Argentina*. EdiUnju, San Salvador de Jujuy, Jujuy, Argentina.



- Ramirez-Castro, M.A. 2010. Detección de *Batrachochytrium dendrobatidis* por medio de técnicas moleculares y microbiológicas en ensamblajes de anfibios en las localidades de Santa María (Boyacá), Samaná (Caldas) y Guanentá (Boyacá). Tesis de licenciatura. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Rivas, Z. P. 2016. *Aeromonas hydrophila* In Amphibians: Harmless Bystander or Opportunistic Pathogen. B.S. Thesis. University of Central Florida, Florida, USA.
- Schadich E. 2009. Skin peptide activities against opportunistic bacterial pathogens of the African clawed frog (*Xenopus laevis*) and three Litoria frogs. *Journal of Herpetology* 43:173-183.
- Simons R.R., R.G. Jaeger & B.E. Felgenhaur. 1997. Competitor assessment and area defense by territorial salamanders. *Copeia* 1997:70-76.
- Webb R. 2010. Culture Methods for Bd. <https://arwh.org/wp-content/uploads/2021/03/Attachment-2-Culture-Methods-for-Bd.pdf> [Consultado en marzo 2023]
- Weiler, A., K. Nuñez, K., K. M. Airaldi Wood, E. O., Lavilla, S. J. Peris Alvarez, & J. D. Baldo, 2013. Anfibios del Paraguay. Universidad Nacional de Asunción; Universidad de Salamanca. Asunción, Paraguay.
- Wisplinghoff, H. & H Seifert. 2017. *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. and Miscellaneous Gram-Negative Bacilli. Pp 181, 1579-1599.e2. Editor(s): Jonathan Cohen, Steven M. Opal, William G. Powderly, *Infectious Diseases* (Third Edition), Cologne, Alemania.
- Woodhams, D.C., V.T. Vredenburg, M.A. Simon, D. Billheimer, B. Shakhtour & Y. Shyr. 2007. Symbiotic bacteria contribute to innate immune defenses of the threatened mountain yellow-legged frog, *Rana muscosa*. *Biological Conservation* 138:390-398.

