

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LA
SECRECIÓN CUTÁNEA DE DOS POBLACIONES DE *Dendropsophus
columbianus* (HYLIDAE) PROVENIENTES DE SITIOS CON DIFERENTE
ESTADO DE ALTERACIÓN EN POPAYÁN - CAUCA.**

EDWIN ROYER CORAL PLAZA

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
PROGRAMA DE BIOLOGIA
POPAYÁN
2010**

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LA
SECRECIÓN CUTÁNEA DE DOS POBLACIONES DE *Dendropsophus
columbianus* (HYLIDAE) PROVENIENTES DE SITIOS CON DIFERENTE
ESTADO DE ALTERACIÓN EN POPAYÁN - CAUCA.**

EDWIN ROYER CORAL PLAZA

Trabajo de grado como requisito parcial para optar el título de Biólogo

DIRECTOR

M. Sc Jimmy Alexander Guerrero Vargas

ASESORES

Bacterióloga Esp. Liliana Caldas Arias

M. Sc Maria Del Pilar Rivas Pava

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
PROGRAMA DE BIOLOGIA
POPAYÁN
2010**

Nota de aceptación

Director: _____
M.Sc Jimmy Alexander Guerrero Vargas.

Jurado: _____
M. Sc José T. Beltrán Vidal

Jurado: _____
Biól. Clara Inés Giraldo

Fecha de sustentación: Popayán, 10 de septiembre de 2010.

DEDICATORIA

*Este trabajo se lo dedico
con todo cariño
a mi papá Luis Eduardo Coral
y mi mamá Fanny Esperanza Plaza
quienes con sus esfuerzos me concedieron la
oportunidad de formarme como
profesional universitario,
también dedico este triunfo
a mis queridos hermanos
Harold Geovanny y Yulieth Andrea Coral Plaza
por brindarme su afecto y apoyo a
lo largo de mi carrera. Por último, quiero
dedicar este trabajo a la presencia
espiritual de mi abuelita
María Lucia Coral.*

AGRADECIMIENTOS

Mis sinceros agradecimientos a la Universidad del Cauca y al Departamento de Biología por ser mi segundo hogar.

Al Centro de Investigaciones Biomédicas Unicauca y en particular a su Coordinador José Beltrán, por su amistad y ayuda para el estudiante, por facilitar la infraestructura, equipos y materiales de dicho Centro.

A los integrantes del Grupo de Investigaciones Herpetológicas y Toxinológicas Unicauca, en especial a Santiago Ayerbe M.D. por su apoyo incondicional, su contagio de sabiduría y alegría, generosidad, por ser Mi Maestro y mi segundo padre; a Harry Morales por darme la mano amiga en los momentos más oportunos; también a Beatriz Sarmiento por brindarme su ayuda en el análisis estadístico de mis datos.

Al laboratorio de Biología y especialmente a mis queridísimos John Meléndez, Darwin Hoyos y José Ricardo Paz, por su enorme paciencia, consejos y siempre buena disposición en laboratorio.

Al Laboratorito de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias de la Salud y en particular a Mirta Olave y Gloria Ávila, por su carisma e incondicional ayuda. De igual forma a Diana Nieto y Angélica Domínguez, por su apoyo, intercambio de saberes y colaboración en la toma de las lecturas de Elisa.

A la Unidad de Microscopía Electrónica, especialmente a Patricia Mosquera, por su gentileza, aportes y compartirme sus experiencias.

Mis más sinceros agradecimientos a la profesora Liliana Caldas, por ser una persona maravillosa que me acompañó incondicionalmente, compartió sus

conocimientos y experiencias; por su paciencia, apoyo, sugerencias, por facilitarme materiales de laboratorio....tantas cosas que permitieron la culminación de la presente investigación.

A Jimmy Alexander Guerrero, director de mi tesis de grado quien compartió sus conocimientos y siempre estuvo atento al buen desarrollo de la presente investigación.

A mis amigos y compañeros del énfasis de Zoología I y II en cabeza de las profesoras María del Pilar Rivas y Giselle Zambrano por sus aportes y críticas constructivas en el inicio del proyecto.

A Rafael Camayo, por su ayuda en las divertidas noches de captura de ejemplares *D. columbianus*.

A mis incondicionales y alegres amigos de carrera Oscar Felipe Jiménez y Juan Pablo Cerrato.

A todos mis compañeros y profesores de los diferentes departamentos y facultades, quienes a diario emprenden la labor de transmitir sus saberes.

A mi familia, comenzando por mis padres, hermanos, abuelos, tíos y primos.

Finalmente a todos aquellos que de alguna forma ayudaron a la terminación de esta investigación.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	16
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
2. JUSTIFICACIÓN	19
3. OBJETIVOS	20
3.1 OBJETIVO GENERAL.....	20
3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	20
4. ANTECEDENTES	21
5. MARCO TEORICO.....	23
5.1 ANFIBIOS	23
5.2 <i>Dendropsophus columbianus</i> (Boettger, 1892).....	23
5.3 PIEL Y SERCRECIÓN CUTÁNEA DE LOS ANFIBIOS	25
5.3.1 Péptidos antimicrobianos de anuros.	27
5.4 BACTERIAS	28
5.4.1 Membrana plasmática.	28
5.4.2 Pared celular.	29
5.4.3 <i>Escherichia coli</i>	30
5.4.4 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30
5.4.5 <i>Staphylococcus aureus</i>	30
5.5 PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA Y CONCENTRACION INHIBITORIA MINIMA (CIM).....	31
6.1 AREA DE ESTUDIO	32
6.2 METODO DE MUESTREO.....	34
6.3 OBTENCIÓN DE LA SECRECIÓN CUTÁNEA.....	35
6.4 ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO DE MICRODILUCIÓN EN CALDO.	35
6.4.1 Preparación del inóculo.....	35
6.4.2 Microdilución.	36
6.4.3 Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM).	38
6.5 DISEÑO EXPERIMENTAL	39
7.1 ESTANDARIZACION DE LA OBTENCION DE LA SECRECIÓN CUTÁNEA DE <i>D. columbianus</i>	40
7.2 PRUEBA DE MICRODILUCIÓN EN CALDO.....	41

7.3 DISTRIBUCION NORMAL, HOMOGENIDAD DE VARIANZAS Y COMPARACIÓN ENTRE BLOQUES	42
7.4 RELACIÓN ENTRE LA PROCEDENCIA DE LAS RANAS Y EL EFECTO SOBRE EL CRECIMIENTO MICROBIANO.....	44
7.5 EFECTO DE LA SECRECION CUTÁNEA DE LAS RANAS COLECTADAS EN PASTIZAL.....	45
7.5.1 Efecto de la secreción cutánea de las ranas colectadas en pastizal sobre el crecimiento de las cepas bacterianas.....	45
7.5.2 Estimación curvilínea, Correlación de Spearman y Regresión lineal	46
7.5.2.1 <i>Escherichia coli</i>	46
7.5.2.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	48
7.5.2.2.1 Concentración Inhibitoria Mínima.....	51
7.5.2.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	51
7.6 EFECTO DE LA SECRECION CUTÁNEA DE LAS RANAS COLECTADAS EN RASTROJO	54
7.6.1 Efecto de la secreción cutánea de las ranas colectadas en rastrojo sobre las cepas bacterianas.....	54
7.6.2 Estimación curvilínea, Correlación de Spearman y Regresión lineal	55
7.6.2.1 <i>Escherichia coli</i>	55
7.6.2.1.1 Concentración Inhibitoria Mínima.....	57
7.6.2.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	58
7.6.2.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	60
7.6.2.3.1 Concentración Inhibitoria Mínima.....	63
8. DISCUSIÓN	64
8.1 RELACIÓN ENTRE LA PROCEDENCIA DE LAS RANAS Y EL EFECTO SOBRE EL CRECIMIENTO MICROBIANO.....	64
8.2 SECRECIÓN CUTÁNEA DE LAS RANAS COLECTADAS EN PASTIZAL	65
8.2.1 Concentración Inhibitoria Mínima <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	65
8.3 SECRECION CUTÁNEA DE LAS RANAS COLECTADAS EN RASTROJO	66
8.3.1 Concentración Inhibitoria Mínima <i>Escherichia coli</i>	66
8.3.2 Concentración Inhibitoria Mínima <i>Staphylococcus aureus</i>	66
9. CONCLUSIONES.....	72
10. RECOMENDACIONES	74
11. LITERATURA CITADA.....	75

ANEXOS	82
--------------	----

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Distribución normal: Kolmogorov – Smirnov.....	43
Tabla 2 Homogeneidad de varianzas: Prueba de Levene.....	43
Tabla 3 Prueba Kruskal Wallis para verificar la diferencia entre los bloques del experimento. Resultado: Significativo marginal.....	44
Tabla 4 Prueba Kruskal Wallis para la comparación de la lectura vs. hábitats.	44
Tabla 5 Prueba Kruskal Wallis para la comparación de la lectura vs. cepas bacterianas, a partir de la secreción cutánea de las ranas colectadas en pastizal.....	45
Tabla 6 Correlación de Spearman entre las concentraciones y las lecturas de <i>E. coli</i> , para la secreción de las ranas colectadas en pastizal.....	48
Tabla 7 Prueba Kruskal Wallis para determinar la diferencia significativa entre las concentraciones y la cepa <i>E. coli</i> a partir de la secreción cutánea de las ranas colectadas en pastizal. Resultado: No significativo.....	48
Tabla 8 Correlación de Spearman entre las concentraciones y las lecturas de <i>P. aeruginosa</i> , para la secreción de las ranas colectadas en pastizal.....	50
Tabla 9 Prueba Kruskal Wallis para determinar la diferencia significativa entre las concentraciones y la cepa <i>P. aeruginosa</i> a partir de la secreción cutánea de las ranas colectadas en pastizal. Resultado: Significativo.....	51
Tabla 10 Correlación de Spearman entre las concentraciones y las lecturas de <i>S. aureus</i> , para la secreción de las ranas colectadas en pastizal.....	53
Tabla 11 Prueba Kruskal Wallis para determinar la diferencia significativa entre las concentraciones y la cepa <i>S. aureus</i> a partir de la secreción cutánea de las ranas colectadas en pastizal. Resultado: No significativo.....	54
Tabla 12 Prueba Kruskal Wallis para la comparación de la lectura vs. cepas bacterianas, a partir de la secreción cutánea de las ranas colectadas en rastrojo.....	54
Tabla 13 de Spearman entre las concentraciones y las lecturas de <i>E. coli</i> , para la secreción de las ranas colectadas en rastrojo.....	57

Tabla 14 Prueba Kruskal Wallis para determinar la diferencia significativa entre las concentraciones y la cepa <i>E. coli</i> a partir de la secreción cutánea de las ranas colectadas en rastrojo. Resultado: Significativo.	57
Tabla 15 Correlación de Spearman entre las concentraciones y las lecturas de <i>P. aeruginosa</i> , para la secreción de las ranas colectadas en rastrojo.....	60
Tabla 16 Correlación de Spearman entre las concentraciones y las lecturas de <i>P. aeruginosa</i> , para la secreción de las ranas colectadas en rastrojo.....	60
Tabla 17 Correlación de Spearman entre las concentraciones y las lecturas de <i>S. aureus</i> , para la secreción de las ranas colectadas en rastrojo.	62
Tabla 18 Prueba Kruskal Wallis para determinar la diferencia significativa entre las concentraciones y la cepa <i>S. aureus</i> a partir de la secreción cutánea de las ranas colectadas en rastrojo. Resultado: Significativo.	63
Tabla 19 Concentración inhibitoria mínima (CIM, mg/ml), para las cepas en las que se determinó actividad antimicrobiana.	70
Tabla 20 CIM (mg/ml) para péptidos aislados de secreciones de diferentes especies de anuros.	70
Tabla 21 Péptidos antimicrobianos, especies y procedencia.	71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Ejemplar de <i>Dendropsophus columbianus</i> ♀	24
Figura 2. Distribución geográfica de <i>Dendropsophus columbianus</i>	25
Figura 3 Glándulas mucosas y granulares de anfibios.....	27
Figura 4 Estructura de una bacteria	28
Figura 5 Pared en bacterias Gram positivas y Gram negativas.	29
Figura 6 Ubicación geográfica del Municipio de Popayán.....	32
Figura 7 Pastizal en el Barrio Villa Elena. Presencia de un estrato herbáceo. .	33
Figura 8 Rastrojo en las afueras de la Facultad de Ciencias Agropecuarias Universidad del Cauca. Presencia de un estrato herbáceo y otro arbustivo. ...	34
Figura 9 Sustrato acuático para <i>D. columbianus</i>	34
Figura 10 Figura 10. Electroestimulación de un individuo <i>D. columbianus</i>	35
Figura 11 Adición del medio de cultivo infusión cerebro corazón (BHI).	36
Figura 12 Diseño de un bloque para la prueba de susceptibilidad antimicrobiana.....	37
Figura 13 Cubrimiento de la placa con papel Parafilm.	38
Figura 14 Lector de Elisa Thermo Electron Corporation Multiskan EX.....	39
Figura 15 Aspecto de la secreción cutánea por enjuague.....	40
Figura 16 Secreción cutánea liofilizada.....	41
Figura 17 Verificación de las buenas prácticas de asepsia.....	41
Figura 18 Verificación del control negativo en unas de las placas, los pozos no presentan turbidez en comparación al control positivo (pozos D1, D2 y D3). ..	42
Figura 19 Curva de la ecuación cuadrática para la concentración vs. lectura de <i>E. coli</i> , para la secreción de las ranas colectadas en pastizal.....	46
Figura 20 Regresión lineal para la concentración vs. lectura de <i>E. coli</i> , para la secreción de las ranas colectadas en pastizal.	47
Figura 21 Curva de la ecuación crecimiento para la concentración vs. lectura de <i>P. aeruginosa</i> , para la secreción de las ranas colectadas en pastizal.	49
Figura 22 Regresión lineal para la concentración vs. lectura de <i>P. aeruginosa</i> , para la secreción de las ranas colectadas en pastizal.	50

Figura 23 Curva de la ecuación cuadrática para la concentración vs. lectura de <i>S. aureus</i> , para la secreción de las ranas colectadas en pastizal.	52
Figura 24 Regresión lineal para la concentración vs. lectura de <i>S. aureus</i> , para la secreción de las ranas colectadas en pastizal.....	53
Figura 25 Curva de la ecuación exponencial para la concentración vs. lectura de <i>E. coli</i> , para el rastrojo.....	55
Figura 26 Regresión lineal para la concentración vs. lectura de <i>E. coli</i> , para la secreción de las ranas colectadas en rastrojo.....	56
Figura 27 Curva de la ecuación lineal para la concentración vs. lectura de <i>P. aeruginosa</i> , para el rastrojo.....	58
Figura 28 Regresión lineal para la concentración vs. lectura de <i>P. aeruginosa</i> , para la secreción de las ranas colectadas en rastrojo.....	59
Figura 29 Curva de la ecuación exponencial para la concentración vs. lectura de <i>S. aureus</i> , para el rastrojo.	61
Figura 30 Regresión lineal para la concentración vs. lectura de <i>S. aureus</i> , para la secreción de las ranas colectadas en rastrojo.....	62
Figura 31 Pozos en los que se evidencia que la turbidez o crecimiento bacteriano disminuyen a medida que las concentraciones son más altas (Pozos de la izquierda).....	69

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 Estadísticos descriptivos para las variables del experimento.....	82
Anexo 2 Prueba Kruskal Wallis para verificar la diferencia entre la interacción de las variables concentración y bacterias (CONBAC), respecto a la lectura. Resultado: No significativo.	82
Anexo 3 Prueba U de Mann-Whitney para la comparación de la cepas a partir de la secreción cutánea de las ranas colectadas en pastizal.	82
Anexo 4 Prueba U de Mann-Whitney para la comparación de la cepas a partir de la secreción cutánea de las ranas colectadas en rastrojo.	83

RESUMEN

A través de la prueba de susceptibilidad antimicrobiana de microdilución en caldo se determinó la actividad antimicrobiana para las cepas *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* a partir de la secreción cutánea total de los individuos de dos poblaciones de *Dendropsophus columbianus* procedentes de sitios con diferente estado de alteración. Los resultados estadísticos revelaron que existe diferencia significativa entre el efecto de las secreciones sobre las cepas microbianas dependiendo de la procedencia; para los individuos provenientes de un pastizal localizado en el Barrio Villa Elena al oriente de la ciudad de Popayán – Cauca se identificó la actividad antimicrobiana de la secreción sobre las cepas *P. aeruginosa*, mientras que para los individuos procedentes del rastrojo de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad del Cauca se determinó la actividad sobre las cepas *E. coli* y *S. aureus*; para los dos casos, la inhibición del crecimiento bacteriano está correlacionado con la utilización de las concentraciones más altas.

Palabras claves: Microdilución en caldo, secreción cutánea, *Dendropsophus columbianus*, actividad antimicrobiana.

INTRODUCCIÓN

Colombia después de Brasil es el país con mayor riqueza de anfibios registrando 698 especies aunque desafortunadamente presenta el primer lugar en cuanto a número de especies anfibias amenazadas (Angulo *et al.* 2006). Los anuros son un grupo de interés no solo por sus características biológicas, marcada vulnerabilidad ante la transformación y degradación de los ecosistemas e indicadores de la calidad ambiental (Dunson *et al.* 1992), también son una excelente fuente de moléculas con actividades biológicas entre las que se destacan péptidos contra infecciones pulmonares causadas por *Pseudomonas aeruginosa* (Hancock y Chapple 1990), péptidos con actividad antifúngica, antiviral, antiparasitaria (Zasloff 1987), anticancerígenos (Rozek *et al.* 2000), péptidos potenciadores de bradiquinina (Conceição *et al.* 2007) y péptidos con actividad espermicida (Zairi *et al.* 2005).

Dado que las ranas pueden sintetizar péptidos antimicrobianos contra un gran número de microorganismos patógenos encontrados en el ambiente (Ohnuma *et al.* 2007), se realizó esta investigación en donde a través de una prueba de microdilución en caldo se identificó y comparó la actividad antimicrobiana de la secreción cutánea total de los individuos de dos poblaciones de *Dendropsophus columbianus* procedentes de dos sitios con diferente estado de alteración en el municipio de Popayán, Cauca.

La finalidad del presente trabajo es aportar información que permita a largo plazo el empleo de esta sustancia natural como un elemento que ayude en el control de infecciones microbianas, desinfección de elementos que requieran estar libres de microorganismos patógenos, además de generar información que se adjunte a la planeación de áreas protegidas.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Varias cepas de bacterias han emergido como importantes patógenos causantes de enfermedades graves, caso de ello son *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* cuyos tratamientos se dificultan debido a su capacidad de adquirir genes de resistencia.

Escherichia coli, produce síndrome urémico hemolítico, colitis hemorrágica, disentería y diferentes cuadros de diarrea (Rodríguez 2002); todas las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* son potencialmente patógenas para el hombre y pueden afectar plantas e invertebrados, además, es uno de los principales patógenos hospitalarios causantes de enfermedades graves (Batlle *et al.* 2005, Martínez *et al.* 2007). Por otra parte, *Staphylococcus aureus* causa infecciones oportunistas al producir enzimas que contribuyen a su virulencia y que ayudan a su propagación (Brook *et al.* 2005), es considerado el mayor patógeno causante de infecciones a la piel y tejidos, neumonía y septicemia (Mamani *et al.* 2006).

Teniendo en cuenta que las anteriores bacterias también pueden ser nocivas para los anfibios, hay que tener presente que la piel de estos se considera la primera barrera contra patógenos puesto que en ella se sintetizan y liberan múltiples péptidos que difieren en especificidad y potencia contra microorganismos patógenos encontrados en el ambiente (Ohnuma *et al.* 2007), en este sentido, *D. columbianus* es una rana con potencial actividad biológica en su secreción cutánea ya que habita tanto en áreas abiertas, como perturbadas y también conservadas y principalmente donde existen cuerpos de agua tales como pequeños lagos, depósitos, pantanos y tierras húmedas (Frost *et al.* 2007, Bolívar *et al.* 2008), básicamente hábitats lenticos cuyas condiciones favorecen la exposición a diversidad de microorganismos patógenos que pueden ocasionar enfermedades que contribuyen a su disminución tal como se ha visto en otras poblaciones (Crawshaw 1992, Blaustein *et al.* 1994). Además, es una rana con distribución en la ciudad de Popayán, Cauca, en donde se encuentran poblaciones en sitios con diferentes estados de alteración y que adicionalmente se encuentran aisladas geográficamente, considerando esto, pueden presentarse cambios en la estructura genética de las poblaciones que a su vez incidan sobre la síntesis proteica y otros aspectos ecológicos y fisiológicos (Klug y Cummings 1999).

En este trabajo se determinó si existe actividad antimicrobiana para las cepas *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* a partir de

la secreción cutánea de individuos de *Dendropsophus columbianus* procedentes de sitios con diferente estado de alteración en el municipio de Popayán – Cauca, adicionalmente se realizó una comparación entre las ranas de los dos sitios de muestreo con el objetivo de identificar si presentan igual actividad antimicrobiana.

2. JUSTIFICACIÓN

Los venenos animales representan una fabulosa fuente de compuestos bioactivos y hasta ahora tan sólo el uno por ciento de estas moléculas se han identificado (Ménez *et al.*, 2006), igualmente hay un desconocimiento de la actividad biológica a partir de las secreciones cutáneas de los anuros con distribución en los países andinos y en Suramérica tan solo Brasil es el país que más aporta información en este campo. Dado que en las glándulas granulares de la piel de los anuros son secretados variedad de componentes es necesario identificar actividades biológicas en estos debido a que pueden tener una aplicación biotecnológica útil al ser humano; hoy en día existen cepas bacterianas perjudiciales y resistentes a diversos antibióticos y los péptidos antimicrobianos provenientes de fuentes naturales como la secreción cutánea anura han atraído la atención como una alternativa de solución y por esta razón se seleccionó la especie *D. columbianus*.

Es importante determinar y comparar este tipo de aplicación biotecnológica entre individuos de poblaciones de *D. columbianus* sometidas a diferentes estados de alteración, pues de encontrarse la actividad antimicrobiana se contribuye con información adicional que justifique la creación de áreas protegidas y principalmente la preservación de los cuerpos de agua con los que la especie se encuentran relacionadas. En nuestro departamento y país no se han desarrollado investigaciones que abarquen simultáneamente aspectos que aporten a la biotecnología y ecología, pues en la mayoría de ocasiones cuando se trabajan con anfibios se incluyen temas de sistemática, filogenia, listados de especies de una determinada localidad, etc., que también son necesarios, aunque el abordaje de estos dos aspectos se convierte en un primer paso que permite a otros visualizar que en nuestro medio existe un arsenal de compuestos con diferentes actividades biológicas, los cuales esperan por ser investigados y pueden convertirse en una herramienta para la conservación de las especies.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la actividad antimicrobiana de la secreción cutánea de individuos de dos poblaciones de *Dendropsophus columbianus* (Hylidae) procedentes de sitios con diferente estado de alteración en Popayán-Cauca.

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

Estandarizar la extracción de la secreción cutánea de *Dendropsophus columbianus* por estimulación eléctrica.

Establecer la Concentración Inhibitoria Mínima de la secreción cutánea de *Dendropsophus columbianus* sobre cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Comparar la efectividad antimicrobiana entre los individuos de las dos poblaciones a partir del análisis estadístico del resultado de las pruebas de susceptibilidad antimicrobianas.

4. ANTECEDENTES

La secreción cutánea de los anfibios se ha considerado como una rica fuente de péptidos farmacológicamente activos y los intereses científicos en péptidos antimicrobianos de anfibios iniciaron después de la purificación del péptido Bombinin de *Bombina variegata* en 1970 y promovidos más aún, después del aislamiento de Magainins de *Xenopus laevis* en 1987 (Nascimento *et al.* 2003). Los primeros estudios enfocados en la identificación de péptidos antimicrobianos requerían del sacrificio de un buen número de individuos de la misma especie, pero hoy en día con la disponibilidad de equipos y técnicas analíticas basta con estímulos eléctricos a un solo individuo sin provocar su muerte (Pukala *et al.* 2006).

Batista *et al.* (2001), a partir de la secreción cutánea de *Phyllomedusa distincta* (Hylidae), aislaron y purificaron el péptido Distinctin demostrando actividad antimicrobiana en las cepas *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Pseudomonas aeruginosa*, adicionalmente analizan las propiedades funcionales y estructurales de dicho péptido; en el mismo año Mangoni *et al.* (2001) comparan el efecto antimicrobiano de la secreción cutánea de dos grupos de *Rana esculenta* sometidas a condiciones de esterilidad y de flora antimicrobiana normal concluyendo que las primeras disminuyen cinco veces su actividad frente al segundo grupo.

Brand *et al.* (2002), de la secreción cutánea de *Phyllomedusa oreades* (Hylidae) aislaron, caracterizaron y realizaron ensayos antimicrobianos del péptido DS 01 contra *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli*, además de otras cepas de la misma especie pero resistentes a los antibióticos meticilina/oxacilina, concluyendo que las concentraciones inhibitorias mínimas al ser comparadas con antibióticos convencionales (Imipenem Gentamicina, Ampicilina y Ceftazidima) muestran considerable efectividad como agente antimicrobiano.

Nascimento *et al.* (2003) destacan el interés farmacéutico por la actividad antimicrobiana de las secreciones cutáneas de anfibios debido a que los péptidos antimicrobianos que allí se encuentran exhiben especificidad hacia membranas de bacterias y una poca o nula afinidad con la membrana de células de vertebrados, también resaltan propiedades bioquímicas y mecanismos de acción de los mismos; simultáneamente, Riera *et al.* (2003), aíslan el péptido Lectins de la piel de *Bufo arenarum* (Bufonidae) determinando la inhibición del crecimiento de las cepas *E. coli*, *Proteus morganii* y *Enterococcus faecalis*.

Nascimento *et al.* (2004) purificaron de la rana Suramericana *Leptodactylus ocellatus* (Leptodactylidae) tres péptidos antimicrobianos denominados Ocellatin 1, 2 y 3 que presentaron actividad contra *E. coli*, aunque mostraron actividad hemolítica en eritrocitos humanos; paralelamente, Prates *et al.* (2004) a partir de la secreción de *Hyla punctata* (Hylidae) aislaron y caracterizaron el péptido catiónico antimicrobiano Hylaseptin, el cual presentó actividad en las bacterias *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *E. coli*, sin provocar alteraciones significativas en células sanguíneas de mamíferos.

Yount *et al.* (2006), a partir de los péptidos antimicrobianos aislados de varias especies de anuros elaboraron su agrupación de acuerdo a la estructura molecular (alfa-hélice, hoja beta y residuos de aminoácidos predominantes con estructura variable), también construyeron un listado de pequeños péptidos antimicrobianos aislados de diferentes grupos taxonómicos presentando para cada uno su estructura, peso molecular y sitio en el que actúan. Pukala *et al.* (2006), destacaron de las secreciones de anfibios la actividad antimicrobiana en los géneros *Ascaphus*, *Bombina*, *Bufo*, *Hyla*, *Leptodactylus*, *Phyllomedusa* y *Xenopus*, además de las actividades antifúngica, antiviral, antitumoral y espermicida. Otros péptidos aislados y caracterizados bioquímicamente de la secreción cutánea de *Phyllomedusa hypocondrialis* (Hylidae) son los denominados Phylloseptins (PS-7) y Dermaseptins (DPh-1) con actividad biológica frente a *Micrococcus luteus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus* (Conceição *et al.* 2006). Así mismo, Brand *et al.* (2006), a partir de la secreción de *Phyllomedusa hypocondrialis*, aislaron seis péptidos antimicrobianos DShypo 01, 02, 03, 04, 06, y 07; en donde, DShypo 01 aparte de mostrar actividad contra *E. coli* y *S. aureus* presentó actividad contra el protozoo *Leishmania amazonensis*.

Ashcroft *et al.* (2007) determinaron a partir de la secreción cutánea de *Litobathes septentrionalis* la acción contra los géneros *Pseudomonas*, *Serratia*, *Bacillus*, *Aeromonas*, *Burkholderia*, *Microbacterium* y *Delftia*, géneros de cepas aislados del hábitat de dicha rana.

Finalmente, Simmaco *et al.* (2009) explicaron que la principal función de los componentes de las secreciones cutáneas son las de inhibir el crecimiento microbiano en la superficie de las ranas.

5. MARCO TEORICO

5.1 ANFIBIOS

Son vertebrados que agrupan los órdenes Anura, Caudata y Gymnophiona que se reproducen mediante puestas de huevos terrestres o acuáticos, estos órdenes varían tanto en forma, coloración y morfología, siendo la piel delgada y húmeda lo que comparten visiblemente. Los anuros son el grupo más grande de los anfibios y carecen de cola en el estadio adulto; el orden Caudata presenta individuos con cuerpos alargados y extremidades con dedos cortos unidos por membranas, contrario al orden Gymnophiona que carece de extremidades, además de presentar vestigios de ojos bajo la piel y agrupar individuos que son de hábitos fosoriales (Duellman 1978).

5.2 *Dendropsophus columbianus* (Boettger, 1892)

Posición Taxonómica

Reino: Animal

Filum: Chordata

Clase: Amphibia

Orden: Anura

Familia: Hylidae

Subfamilia: Hylinae

Género: *Dendropsophus*

Especie: *Dendropsophus columbianus* (Boettger, 1892)

La familia Hylidae agrupa especies que presentan dedos manuales con anchos discos adhesivos y dedos pediales moderadamente palmeados, presentan cartílagos intercalares entre las dos últimas falanges las cuales terminan en forma de una garra; las anteriores características permiten a estas ranas ser arborícolas, existiendo pequeñas y grandes, de coloraciones crípticas y otras vivamente coloreadas como en el caso del género *Phyllomedusa*.

Desde el punto de vista sistemático y taxonómico esta familia ha tenido cambios a nivel de géneros y especies, hecho observado en *D. columbianus* que anterior a la publicación de Faivovich *et al.* (2005) se conocía como *Hyla columbiana*. Actualmente *D. columbianus* es una especie que se encuentra en la categoría de preocupación menor y no se conocen áreas protegidas para la

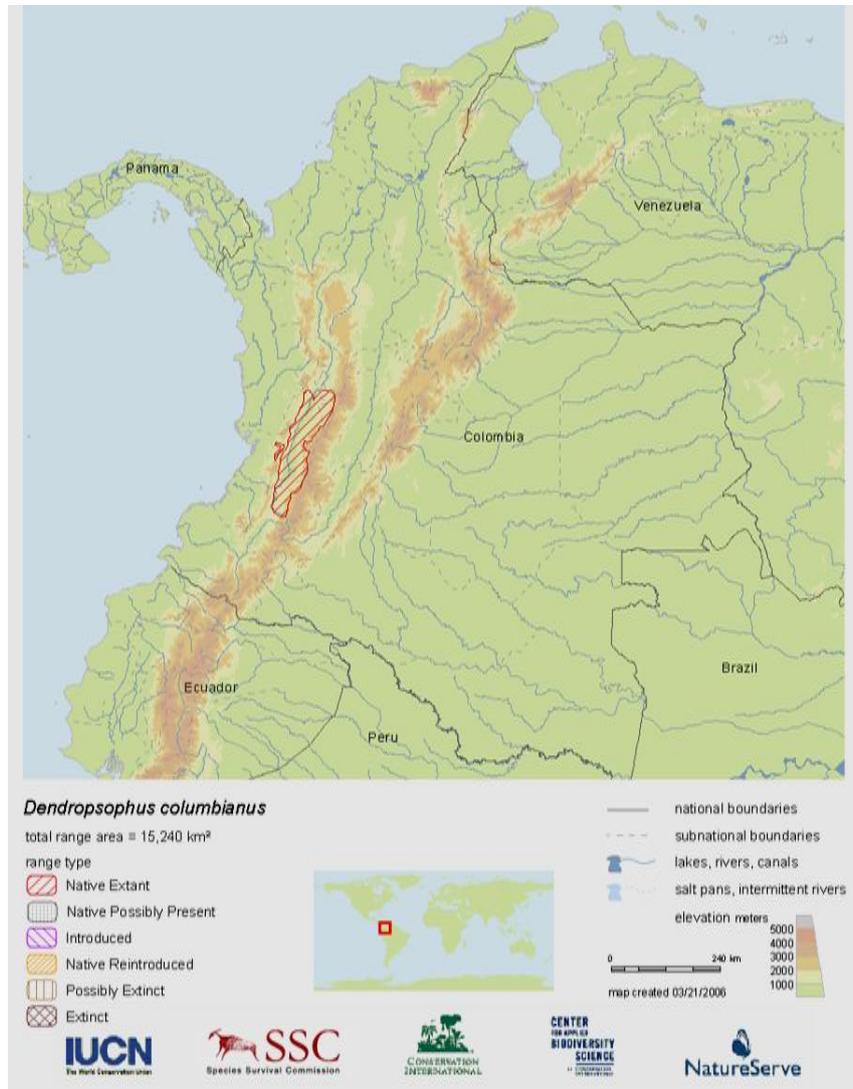
misma según la lista roja de la Unión internacional para la conservación de la naturaleza (IUCN) (Bolívar *et al.* 2008). Es una rana de pequeño tamaño, las hembras tienen coloración amarilla en el vientre con manchas oscuras a diferencia de los machos que tienen un vientre muy claro y el dorso dorado (Figura 1); típicamente está asociada con áreas abiertas, suelos húmedos y sobre todo donde hay cuerpos de agua como pequeños lagos, depósitos de agua y pantanos; se distribuye en zonas perturbadas y áreas todavía conservadas, es una especie nocturna aunque sus cantos pueden ser escuchados en el día. Habita desde los 950 hasta los 2300 msnm, con distribución sobre la Vertiente Occidental de la Cordillera Central y la Vertiente Oriental de la Cordillera Occidental en los Departamentos de Cauca, Quindío, Risaralda y Valle del Cauca (Figura 2) (Frost *et al.* 2007, Bolívar *et al.* 2008).

Figura 1 Ejemplar de *Dendropsophus columbianus* ♀



Fot.: Coral, Edwin.

Figura 2. Distribución geográfica de *Dendropsophus columbianus*



Fuente: http://www.puce.edu.ec/zoologia/vertebrados/amphibiawebec/especies/anura/hylidae/columbianus/columbianus_m.gif

5.3 PIEL Y SERCRECIÓN CUTÁNEA DE LOS ANFIBIOS

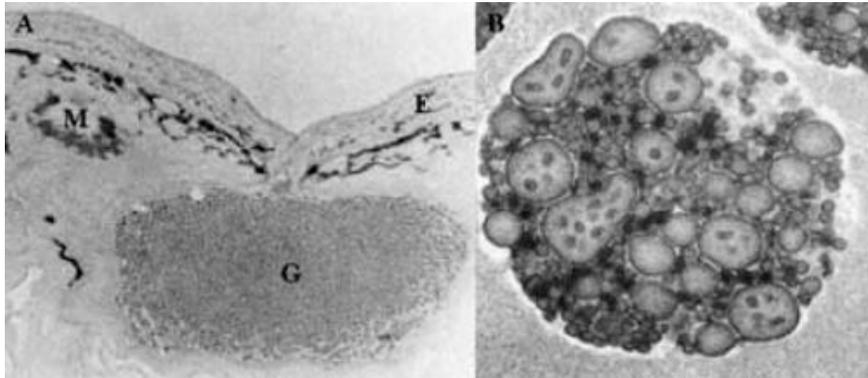
En los anfibios, la respiración cutánea y osmorregulación son tareas que se llevan a cabo en la piel, esta se compone de una delgada capa de células densamente poblada de glándulas hidratantes que facilitan el intercambio de gases. A pesar de ser una débil barrera contra el estrés biótico y físico, la

epidermis y en particular el estrato córneo, ha evolucionado en un mecanismo complejo de defensa en donde una amplia gama de componentes son secretados rápidamente por las glándulas granulares que cubren la piel (Prates *et al.* 2004). Estas secreciones aparte de proveer un mecanismo de defensa frente a predadores, también contienen agentes antimicrobianos como en el caso del péptido Magainin de *Xenopus laevis* que protege contra infecciones causadas por bacterias, hongos y protozoarios (Zasloff 1987).

La piel de los anfibios cumple importantes funciones como la prevención de la abrasión, la respiración cutánea, el control de la osmorregulación y termorregulación además de proteger contra predadores y patógenos (Stebbins y Cohen 1995 citado por Nascimento *et al.* 2003).

En la piel de los anfibios existen dos tipos de glándulas acinares: las glándulas mucosas y granulares (estas últimas, también conocidas como glándulas serosas o venenosas) (Figura 3). Las glándulas mucosas usualmente están en mayor número y secretan mucina, un elemento lubricante involucrado en el mantenimiento de la humedad, lubricación de la piel y termorregulación. Las glándulas granulares son responsables de la producción de la mayoría de sustancias tóxicas y nocivas encontrándose secreciones que contienen componentes activos como moléculas alifáticas, aromáticas, aminas biogénicas, esteroides, alcaloides, bufodienólidos, péptidos y proteínas que producen efectos neurotóxicos, vasoconstrictores, alucinógenos, hipotensivos, citotóxicos y antimicrobianos (Daly *et al.* 1978, Lazarus y Atilla 1993, Rinaldi 2002, Pukala *et al.* 2006). Para el campo de la medicina hay aspectos interesantes como el aislamiento y purificación de péptidos que actúan contra el agente etiológico de la malaria *Plasmodium falciparum* (Krugliak *et al.* 2000), aerosoles contra infecciones pulmonares por *Pseudomonas aeruginosa* (Hancock y Chapple 1990), péptidos con actividad antifúngica, antiviral, antiparásitos y anticáncer (Rozek *et al.* 2000); incluso, existe un medicamento de uso tópico llamado LOCILEX cuyo principio activo es Magainina II, un péptido antimicrobiano aislado de la secreción cutánea de la rana *Xenopus laevis* que ayuda en el tratamiento de úlceras diabéticas (Hancock y Chapple 1999), péptidos potenciadores de bradiquinina (Conceição *et al.* 2007), además de péptidos con actividad espermicida (Zairi *et al.* 2005). Otras aplicaciones son el tratamiento de infecciones en peces, preservación de flores y alimentos.

Figura 3 Glándulas mucosas y granulares de anfibios



A) Sección transversal de la piel dorsal de *Odontophrynus cultripes* (Leptodactylidae). E, epidermis; G, Glándula granular y M, Glándula mucosa. Tinción PAS. B) Microscopía electrónica de un gránulo secretor en el lumen de una glándula granular de la piel de *O. cultripes* (Nascimento *et al*, 2003).

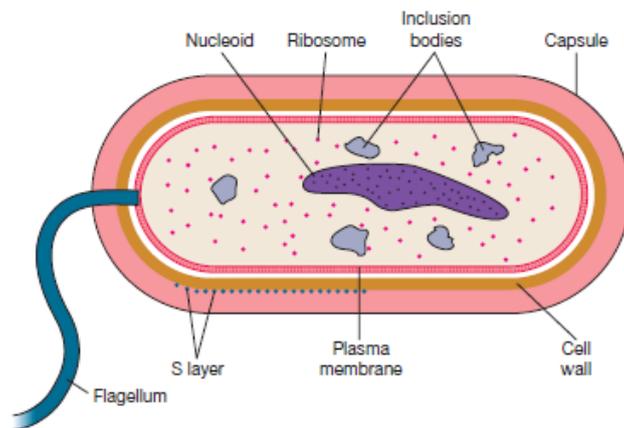
5.3.1 Péptidos antimicrobianos de anuros. En la secreción cutánea de anfibios y particularmente en ranas, existen péptidos antimicrobianos que representan una primera barrera o línea de defensa contra la invasión de microorganismos patógenos, muchos de estos péptidos antimicrobianos muestran especificidad hacia membranas de bacterias, mientras hay una pobre afinidad con la membrana de células de vertebrados (Nascimento *et al.* 2003), dichos péptidos, presentan interacción con las estructuras más externas de las bacterias, como la membrana plasmática y la pared celular para llevar a cabo su actividad (Hancock y Chapple 1999, Zhao 2003).

Los antibióticos clásicos podrían ser combinados con péptidos antimicrobianos, incluso se han combinado péptidos para obtener una mayor potencia, ejemplo de lo anterior ha sido la combinación de Magainin 2 – PGLa y Dermaseptins y por otro lado la mezcla de Tachyplesin I – Magainin 2, (péptidos antimicrobianos de secreciones cutáneas de anuros) para este último caso mejorando propiedades microbicidas en infecciones por patógenos resistentes (Kobayashi *et al.* 2001).

5.4 BACTERIAS

Las bacterias son organismos procariotas que se diferencian de los eucariotas al no poseer un verdadero núcleo, es decir, que el material hereditario no se encuentra rodeado por una membrana nuclear. Muchos de estos microorganismos causan enfermedades y cambios perjudiciales en alimentos, aunque también desempeñan papeles beneficiosos como la síntesis de vitaminas en el tracto intestinal de animales y la descomposición que ayuda a devolver nutrientes importantes al suelo. Las estructuras que se encuentran en las bacterias son la membrana celular, ribosomas, región nuclear, pared celular (en la mayoría de los casos), flagelos, vellosidades, cápsulas, capas mucosas, vacuolas de gas y esporas (Figura 4) (Brock 1978).

Figura 4 Estructura de una bacteria



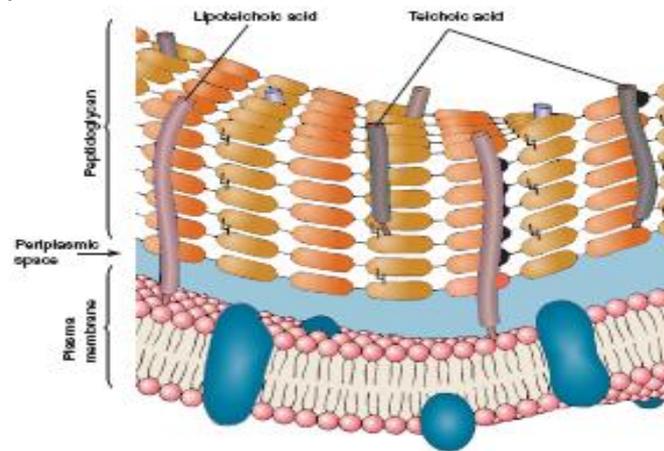
Fuente: Prescott, Harley y Klein, 2002.

5.4.1 Membrana plasmática. Es la estructura que rodea a la célula y separa su interior del medio produciéndose la muerte si hay destrucción de ella. Sus principales componentes son fosfolípidos y proteínas, los fosfolípidos presentan un lado hidrofílico y otro hidrofóbico, mientras que las proteínas son hidrofóbicas (Brock 1978). Haciendo referencia a dichos fosfolípidos, se dice que son aniónicos y contienen fosfatidilglicerol, fosfatidilserina y cardiolipina, constituyentes electronegativos que son orientados hacia el lado interno de la membrana y que por tanto le confiere una carga negativa neta, que permite la interacción con los péptidos antimicrobianos catiónicos (Yount *et al.* 2006).

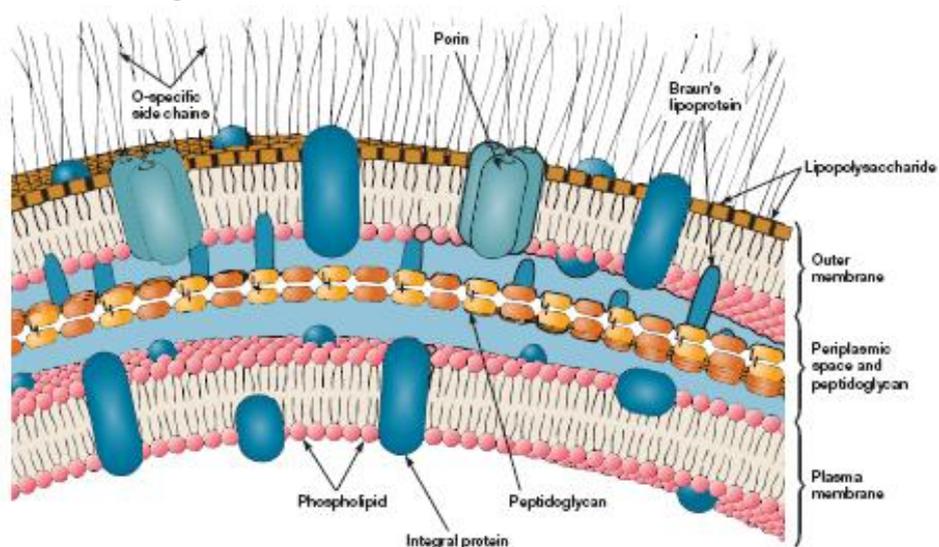
5.4.2 Pared celular. Le confiere rigidez y forma, siendo químicamente diferente de la célula eucariótica. Las bacterias Gram negativas presentan una estructura pluriestratificada y compleja, mientras que las Gram positivas exhiben una única capa que a menudo es más gruesa (Figura 5). En las bacterias Gram positivas hasta un 90% de la pared celular está constituido por glucoproteína y el resto de pequeñas cantidades de ácido teitoico (cargado negativamente), mientras que en las bacterias Gram negativas solo un 5 a 20% de la pared es glucoproteína y el resto de su pared está constituida por lípidos, polisacáridos y proteínas que generalmente están presentes en una capa al exterior de la capa de glucoproteína (Brock 1978).

Figura 5 Pared en bacterias Gram positivas y Gram negativas.

Bacterias Gram positivas



Bacterias Gram negativas



Fuente: Prescott, Harley y Klein, 2002.

5.4.3 *Escherichia coli*. Pertenece a la familia Enterobacteriaceae, siendo un bacilo Gram negativo y anaerobio facultativo que no requiere de oxígeno para crecer, aunque puede crecer en su presencia, es neutrófilo con crecimiento óptimo en rangos de pH de 5.5 a 8 y puede encontrarse en las aguas sin tratar (Prescott *et al.* 2002), se considera una bacteria de la flora normal aunque existen cepas causantes de diarrea, síndrome urémico hemolítico, colitis hemorrágica y cuadros de disentería, principalmente en niños. Estas cepas de *E. coli* productora de diarrea son: enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroinvasiva (EIEC), enteropatógena (EPEC), enteroagregativa (EAEC) y de adherencia difusa (DAEC) (Rodríguez 2002).

5.4.4 *Pseudomonas aeruginosa*. Es una bacteria Gram negativa perteneciente al grupo de bacilos no fermentadoras de glucosa, MacConkey y oxidasa positivas y otras relacionadas (Forbes *et al.* 2004), es un organismo aerobio obligado que puede formar biopelículas que lo protegen de antibióticos y detergentes. Se puede aislar de muestras de suelo, aguas prístinas y contaminadas por ser un microorganismo osmotolerante (Prescott *et al.* 2002), así como de plantas y animales. Todas las cepas son potencialmente patógenas para el hombre y pueden afectar plantas e invertebrados. En personas, los enfermos de fibrosis quística resultan vulnerables, pues colonizan el tracto respiratorio produciendo infección incluso en los pulmones en la etapa final de la enfermedad (Soberón 2001).

5.4.5 *Staphylococcus aureus*. Son cocos, Gram positivos dispuestos en racimos, que suele constituir parte de la microflora normal humana y que pueden ocasionar infecciones oportunistas debido a la producción de enzimas que contribuyen a su virulencia y propagación; generalmente forma colonias de color gris o amarillo dorado (Brook *et al.* 2005). Es un anaerobio facultativo (Prescott *et al.* 2002) considerado el mayor patógeno causante de infecciones en la piel y tejidos, neumonía y septicemia en el hombre; han emergido cepas resistentes a meticilina y otros agentes antibacterianos llegando a ser una preocupación en el ambiente hospitalario debido a las infecciones sistémicas que ocasiona (Mamani *et al.* 2006).

5.5 PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA Y CONCENTRACION INHIBITORIA MINIMA (CIM)

Son pruebas que permiten establecer la interacción entre un agente antibacteriano y una bacteria, midiendo cuantitativamente la actividad *in vitro* contra la bacteria seleccionada; dichas pruebas se dividen en dos categorías: las pruebas de dilución y las de difusión. En las pruebas de dilución se requiere de una serie de tubos o placas que son preparadas con caldo para posteriormente agregarles varias concentraciones de los agentes antimicrobianos y así ser inoculados con una suspensión estandarizada de la bacteria a evaluar. Se procede a incubar generalmente por espacio de 16 a 20 horas a una temperatura de 35°C y finalmente se establece la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) (NCCLS, 2000).

En las pruebas de dilución es posible realizar microdilución y macrodilución, siendo las cantidades de caldo o medio para el crecimiento del microorganismo lo que las diferencia; en el primer caso se utiliza generalmente 0.1 ml de caldo que se vierten sobre bandejas estériles que tienen pocillos, mientras que para el segundo las cantidades parten de 1 ml y son agregados en tubos estériles de 13x100 mm.

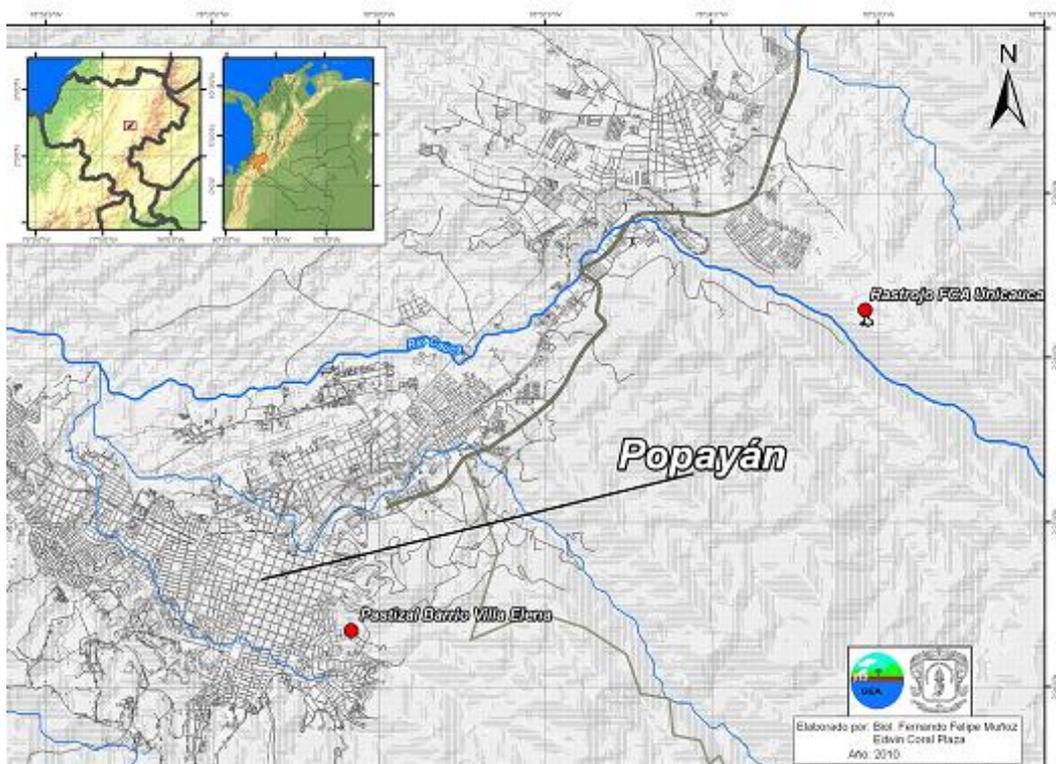
En general, las pruebas de susceptibilidad son utilizadas para predecir el resultado de una terapia antimicrobiana, epidemiología de la resistencia, evaluación de la combinación de antibióticos y estudio de nuevos agentes antimicrobianos (NCCLS, 2000).

6. MATERIALES Y METODOS

6.1 AREA DE ESTUDIO

El Municipio de Popayán (Figura 6) se localiza al sur occidente de Colombia y hace parte del departamento del Cauca entre los 2° 27' de latitud norte y 76° 37' de longitud desde el Meridiano de Greenwich, haciendo parte del Altiplano de Popayán y el Piedemonte de la cordillera Central. La cabecera municipal se ubica en el valle de Pubenza, localizada a los 02° 26' 39" de latitud norte y 76° 37' 17" de longitud oeste con una altura sobre el nivel del mar de 1.738 metros. Al Norte limita con los municipios de Cajibío y Totoró, al Este con Totoró y Puracé, al Sur con Puracé y Sotaró y al Oeste con Timbío y el Tambo (CRC, 2003).

Figura 6 Ubicación geográfica del Municipio de Popayán.



Elaborado por: Fernando Felipe Muñoz, 2010

Se seleccionaron dos sitios de muestreo con diferente estado de alteración desde el punto de vista de la estructura vegetal y en particular el número de estratos verticales:

- Pastizal en el Barrio Villa Elena. Coordenadas: W: 76° 36' 10.0", N: 02° 26' 20.5", h: 1748 m, Precisión: 6.9 m. Pastizal con poca presencia de plantas leñosas sobresaliendo hierbas Zingiberaceae, Asteraceae, Acantaceae, Amamelidaeceae y enredaderas Aposinaceae que evidencian la presencia de un estrato rasante o herbáceo que rodean un humedal en el que sobresale vegetación flotante con abundancia de Ciperacea y Poaceae (Figura 7).

Figura 7 Pastizal en el Barrio Villa Elena. Presencia de un estrato herbáceo.



Fot.: Coral, Edwin

- Rastrojo en las afueras de Popayán y aledaño a la Facultad de Ciencias Agropecuarias Universidad del Cauca. Coordenadas: W: 76° 33' 21.9", N: 02° 28' 35.5", h: 1885, Precisión 9.9 m. El sitio se caracteriza por presentar arbustos de la familia Melastomataceae, Myrtaceae, Rosaceae (mora silvestre del genero *Rubus*) y Verbenaceae como representante de un estrato arbustivo. Adicionalmente, existe una cobertura o estrato herbáceo dominado por Ciperaceae y Poaceae que en su conjunto rodean un humedal, denotando así la presencia clara de dos estratos o coberturas vegetales (Figura 8).

Figura 8 Rastrojo en las afueras de la Facultad de Ciencias Agropecuarias Universidad del Cauca. Presencia de un estrato herbáceo y otro arbustivo.



Fot.: Coral, Edwin.

6.2 METODO DE MUESTREO

La captura de individuos *D. columbianus* se realizó entre las 18:00 y 22:00 horas, efectuando una búsqueda libre sin restricciones además de seguir los cantos efectuados por los machos, 14 individuos adultos de cada sitio fueron puestos en cautiverio proporcionándoles un sustrato acuático (Figura 9) además de alimento.

Figura 9 Sustrato acuático para *D. columbianus*



Fot.: Coral, Edwin.

6.3 OBTENCIÓN DE LA SECRECIÓN CUTÁNEA

Se utilizó un estimulador eléctrico Square wave stimulator-Lafayette de voltaje graduable y corriente directa (DC) que por estímulos de voltaje graduable permitieron conocer el valor mínimo en el cual la rana produjo la secreción. Catorce ranas adultas de cada población fueron estimuladas, colocando un electrodo envuelto en algodón y humedecido con agua sobre la gula y el otro electrodo sobre el extremo posterior del cuerpo (Figura 10), se inicio con un voltaje equivalente a 0.01 mV, de corriente directa, posteriormente se fue incrementando dicho valor, hasta llegar a un valor de 20 voltios y una intensidad de 100 eventos por segundos, a cada individuo se le suministraron tres estimulaciónes con intervalos de un segundo de descanso y cada estimulación duró tres segundos. De cada sitio de colecta (14 individuos) bajo condiciones de asepsia se colectó la secreción por enjuague a presión con agua desionizada y esterilizada sobre un Beacker, la secreción se alicuotó en tubos eppendorf de 1.5 ml y se centrifugaron a 12000 r.p.m., a 10°C durante 15 minutos, se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf previamente pesado y rotulado, para congelar y liofilizar; el peso de la secreción se obtuvo por diferencia entre el peso del tubo con el liofilizado y el peso del tubo vacío.

Figura 10 Electroestimulación de un individuo *D. columbianus*.



Fot.: Coral, Edwin.

6.4 ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO DE MICRODILUCIÓN EN CALDO.

6.4.1 Preparación del inóculo. 24 horas previas a la prueba de microdilución se realizo la resiembra de las cepas *Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 y *Staphylococcus aureus* ATCC25923

en agar Mueller Hinton, tomándose de tres a cinco colonias bien aisladas, de tamaño y morfología similar con un asa de punta redonda para luego transferirse a un tubo que contenía 5 ml de caldo BHI (Brain Heart Infusión), luego se incubó por espacio de 4-6 horas a una temperatura de 37°C para alcanzar el valor 0.5 McFarland equivalente a una suspensión que contiene alrededor de 1 a 2 x 10⁸ UFC/ml, siendo el equipo Densimat necesario para tal ajuste.

En los 15 minutos previos al desarrollo de la prueba se ajusto la turbidez de la suspensión 0,5 McFarland, diluyendo 2 ml de dicha suspensión en 38 ml de agua destilada desionizada y esterilizada (dilución 1:20) para que la concentración final en cada pozo de la placa de Elisa fuera 5 x 10⁵ UFC/ml.

6.4.2 Microdilución. Debido a que el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad del Cauca se rige por la normatividad NCCLS 1997, 1998, 2000, el procedimiento se manejó bajo dichos lineamientos.

Se preparó una solución de secreción cutánea de 2 mg/ml bajo cámara de flujo laminar, en una placa de Elisa se realizaron las diluciones y el experimento se efectuó por triplicado utilizando medio de cultivo e inóculo como control positivo y medio de cultivo, inóculo y Cloranfenicol ó Trimetropín como control negativo.

En una placa de Elisa estéril se adicionaron con micropipeta 100 µl del medio de cultivo infusión cerebro corazón – Brain Heart Infusion (BHI) (Figura 11) en todos los pozos con excepción de los pozos A1, A2 y B2 (pozos de color gris en la figura 12), puntos o pozos de referencia necesariamente vacios para el lector de Elisa.

Figura 11 Adición del medio de cultivo infusión cerebro corazón (BHI).



Fot.: Coral, Edwin

Figura 12 Diseño de un bloque para la prueba de susceptibilidad antimicrobiana.

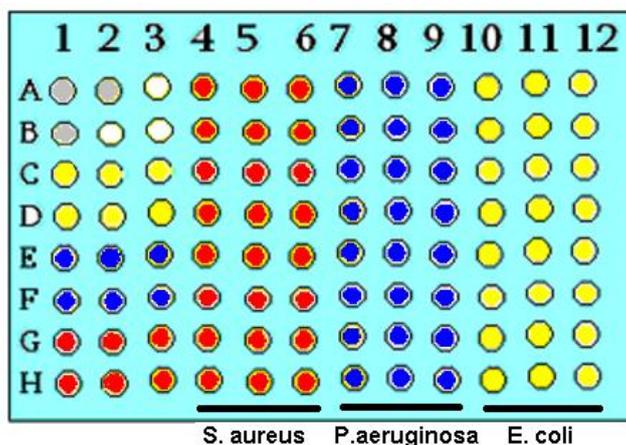


Imagen: Coral, Edwin.

De la solución 2 mg/ml se tomaron con micropipeta 100 µl que se agregaron al pozo A12, allí mismo se realizó una homogenización pipeteando 10 veces teniendo precaución de no salpicar los pozos cercanos; del pozo A12, nuevamente se tomaron 100 µl y se depositaron en el pozo B12 homogenizando de inmediato y así continuamente hasta el pozo H12 donde se tomaron 100 µl que se descartaron, obteniendo un volumen final de 100 µl para cada pozo (100 µl de medio de cultivo BHI, mas 100 µl de secreción cutánea) que contienen las siguientes concentraciones:

A12: 1 mg/ml - **B12:** 0.5 mg/ml - **C12:** 0.25 mg/ml - **D12:** 0.125 mg/ml - **E12:** 0.0625 mg/ml - **F12:** 0.03125 mg/ml - **G12:** 0.0156 mg/ml - **H12:** 0.00781 mg/ml.

Se procede igualmente para los pozos de las columnas 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5 y 4 (Figura 12).

Luego se establecieron los controles negativos o inhibición que requirieron para el respectivo pozo el uso de 100 µl de Trimetropin 2 mg/ml (*E. coli* y *S. aureus*) y Cloranfenicol 2mg/ml (*P. aeruginosa*) según sea el caso; los pozos destinados para los controles negativos fueron C1, C2 y C3 (Trimetropin – *E. coli*), E1, E2 y E3 (Cloranfenicol – *P. aeruginosa*) y G1, G2 y G3 (Trimetropin – *S. aureus*) (Figura 12).

El último paso fue la adición del inóculo (cepas) que presenta una concentración final de 5×10^5 UFC/ml. Las columnas 10, 11 y 12 se inoculan con la cepa *E. coli*; 7, 8 y 9 con la cepa *P. aeruginosa* y las columnas 4, 5 y 6 con la cepa *S. aureus* (Figura 12).

Los pozos D1, D2, D3; F1, F2, F3 y H1, H2, H3 se destinaron como control positivo o crecimiento por lo que no llevan ninguna dilución de la solución stock y son inoculados solo con las cepas: D1, D2 y D3 con *E. coli*; F1, F2 y F3 por *P. aeruginosa* y H1, H2 y H3 con la cepa *S. aureus* (Figura 12).

La cantidad de inóculo equivalente a un volumen de 10 μ l se puede agregar con la misma punta por cada columna. Finalmente se cubrió la placa con papel Parafilm (Figura 13) y se procede a incubar a 37°C por espacio de 18 horas.

Figura 13 Cubrimiento de la placa con papel Parafilm.



Fot.: Coral, Edwin.

Los pozos de color blanco en la figura 12 (A3, B2 y B3) son los controles de esterilidad que solo llevan medio de cultivo, de tal forma que indican la asepsia con la que se realiza la prueba además de indicar la esterilidad del medio de cultivo, aspectos importantes en las pruebas microbiológicas.

6.4.3 Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM). La CIM se consideró como la concentración más baja en la que se observa una disminución de la densidad óptica igual o superior al 50 por ciento con respecto a la del control de crecimiento. Posterior a la incubación se tomó el valor de la densidad óptica o lectura a través del lector Elisa Thermo Electron Corporation Multiskan EX (Figura 14) a una longitud de onda de 620 nm, el valor obtenido para cada pozo de las placas es una medida espectrofotométrica que se relaciona con la turbidez de la suspensión bacteriana, por tanto que altos valores de lectura o absorbancia indiquen mayor turbidez debido a la cantidad de células como resultado del crecimiento bacteriano.

Figura 14 Lector de Elisa Thermo Electron Corporation Multiskan EX.



Fot.: Coral, Edwin.

6.5 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se realizó un diseño experimental de bloques no aleatorios, para cada sitio se montaron por triplicado tres bloques correspondientes a cada bacteria y en cada bloque se efectuaron tres repeticiones, cada repetición con diez tratamientos correspondientes a ocho concentraciones de secreción cutánea además del control positivo y negativo (Figura 12). El análisis estadístico de los datos se efectuó con el software SPSS (Statistical Package for Social Scientific), versión académica 11.0, mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis complementada con la prueba U de Mann-Whitney. Para determinar el valor de la CIM se identificó a través de estimación curvilínea la fórmula que mejor expresó la relación de dependencia entre la variable dependiente (lectura) y la variable independiente (concentración) para luego despejar en cada caso la variable concentración, además se realizó la correlación de Spearman para verificar el tipo de correlación entre las variables, soportadas por las graficas de regresión lineal.

7. RESULTADOS

7.1 ESTANDARIZACION DE LA OBTENCION DE LA SECRECION CUTÁNEA DE *D. columbianus*

La secreción cutánea de las dos poblaciones fue una sustancia incolora que presenta olor y sabor amargo, por cada sitio de colecta se recogieron aproximadamente 50 ml de una mezcla de agua y secreción cutánea de apariencia viscosa y espumosa (Figura 15). Cuando se efectuaron estimulaciones con valores bajos de voltaje no se observó estrés alguno en los individuos, sin embargo, cuando las estimulaciones se acercaron a un valor de 20 V, las ranas estiraron sus extremidades posteriores y falanges y se produjo un olor amargo indicando la producción de secreción; este es un método no invasivo en el que los individuos no mueren y se recuperan en un lapso de diez minutos. La secreción liofilizada presentó coloración blanca, aspecto fibroso, lanoso o algodónoso (Figura 16), sin olor y aún con sabor amargo.

Figura 15 Aspecto de la secreción cutánea por enjuague.



Fot.: Coral, Edwin.

Figura 16 Secreción cutánea liofilizada.

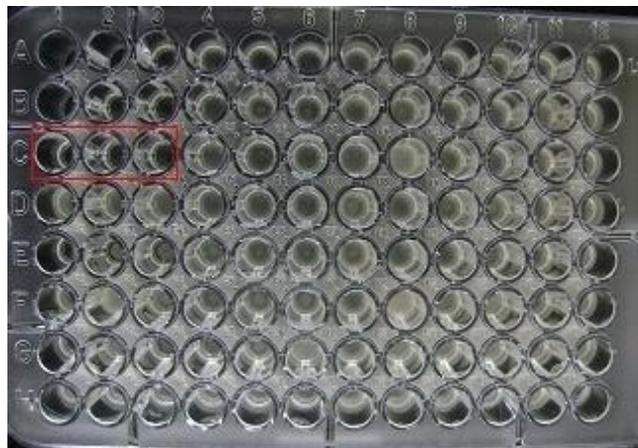


Fot.: Coral, Edwin.

7.2 PRUEBA DE MICRODILUCIÓN EN CALDO

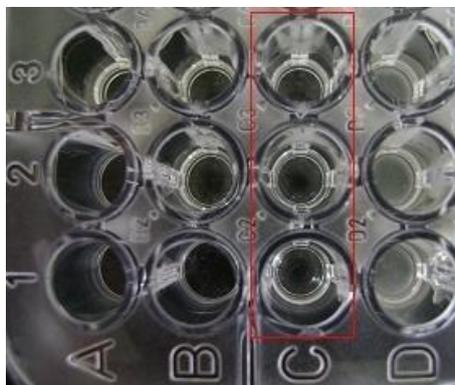
Luego de incubar tras realizar el procedimiento de microdilución en caldo, se verificaron las buenas prácticas de asepsia, al observar la transparencia y no crecimiento bacteriano de los pozos de esterilidad, de igual forma, los pozos negativos que contenían los antibióticos Trimetropín o Cloranfenicol 2mg/ml inhibieron satisfactoriamente el crecimiento de las cepas (recuadro en rojo de las figuras 17 y 18).

Figura 17 Verificación de las buenas prácticas de asepsia.



Fot.: Coral, Edwin.

Figura 18 Verificación del control negativo en unas de las placas, los pozos no presentan turbidez en comparación al control positivo (pozos D1, D2 y D3).



Fot.: Coral, Edwin.

7.3 DISTRIBUCION NORMAL, HOMOGENIDAD DE VARIANZAS Y COMPARACIÓN ENTRE BLOQUES

En primera instancia se presentan los estadísticos descriptivos, con el objetivo de dar a conocer las variables utilizadas en el análisis estadístico (Anexo 1). Los resultados estadísticos indicaron que las lecturas o valores de absorbancia no se ajustan a la distribución normal (Kolmogorov – Smirnov; $p < 0.05$) (Tabla 1) ni a la homogeneidad de varianzas (Levene; $p < 0.05$) (Tabla 2) en consecuencia los análisis estadísticos se realizaron mediante las pruebas Kruskal Wallis y U de Mann-Whitney.

La comparación entre los bloques a partir de la prueba no paramétrica Kruskal Wallis muestra que existe una diferencia significancia marginal estadística (Sig. asintót.: 0.050) (Tabla 3), con esta prueba también se verifica que no hay diferencia significativa entre la interacción de las variables concentración y bacterias (CONBAC) respecto a la lectura (Anexo 2).

Tabla 1 Distribución normal: Kolmogorov – Smirnov.

Resumen del procesamiento de los casos

concentracion	Casos					
	Válidos		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
lectura ,00000	54	100,0%	0	,0%	54	100,0%
,00781	54	100,0%	0	,0%	54	100,0%
,01560	54	100,0%	0	,0%	54	100,0%
,03125	54	100,0%	0	,0%	54	100,0%
,06250	54	100,0%	0	,0%	54	100,0%
,12500	54	100,0%	0	,0%	54	100,0%
,25000	54	100,0%	0	,0%	54	100,0%
,50000	54	100,0%	0	,0%	54	100,0%
1,00000	54	100,0%	0	,0%	54	100,0%

Tabla 2 Homogeneidad de varianzas: Prueba de Levene.

Prueba de homogeneidad de la varianza

		Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
lectura	Basándose en la media	2,103	8	477	,034
	Basándose en la mediana.	1,900	8	477	,058
	Basándose en la mediana y con gl corregido	1,900	8	441,109	,058
	Basándose en la media recortada	1,980	8	477	,047

Tabla 3 Prueba Kruskal Wallis para verificar la diferencia entre los bloques del experimento. Resultado: Significativo marginal.

bloques		N	Rango promedio
lectura	bloque 1	162	260,86
	bloque 2	162	223,07
	bloque 3	162	246,56
	Total	486	

Estadísticos de contraste^{a,b}

	lectura
Chi-cuadrado	5,982
gl	2
Sig. asintót.	,050

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: bloques

7.4 RELACIÓN ENTRE LA PROCEDENCIA DE LAS RANAS Y EL EFECTO SOBRE EL CRECIMIENTO MICROBIANO

La secreción cutánea de los individuos de las dos poblaciones tuvieron efectos diferentes sobre el crecimiento bacteriano, el resultado de la prueba Kruskal Wallis revela que hay una diferencia altamente significativa entre los hábitats o sitios de colecta respecto a la lectura o crecimiento bacteriano (Sig. asintót.: 0.000) (Tabla 4).

Tabla 4 Prueba Kruskal Wallis para la comparación de la lectura vs. hábitats.

habitat		N	Rango promedio
lectura	Pastizal	243	269,97
	Rastrojo	243	217,03
	Total	486	

Estadísticos de contraste^{a,b}

	lectura
Chi-cuadrado	17,269
gl	1
Sig. asintót.	,000

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: habitat

7.5 EFECTO DE LA SECRECION CUTÁNEA DE LAS RANAS COLECTADAS EN PASTIZAL

7.5.1 Efecto de la secreción cutánea de las ranas colectadas en pastizal sobre el crecimiento de las cepas bacterianas. La secreción de las ranas provenientes de pastizal produjo efectos diferentes de crecimiento o inhibición en las tres cepas de bacterias, la prueba Kruskal Wallis muestra que hay una alta diferencia estadística (Sig. asintót. 0.000) (Tabla 5) al comparar la lectura vs. las cepas bacterianas.

Tabla 5 Prueba Kruskal Wallis para la comparación de la lectura vs. cepas bacterianas, a partir de la secreción cutánea de las ranas colectadas en pastizal.

Rangos

	bacterias	N	Rango promedio
lectura	E. coli	81	133,31
	P. aeruginosa	81	169,70
	S. aureus	81	62,99
	Total	243	

Estadísticos de contraste^{a,b}

	lectura
Chi-cuadrado	96,494
gl	2
Sig. asintót.	,000

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: bacterias

Se tuvo que el crecimiento de las cepas presentan un valor significativo frente a la secreción cutánea y por tanto se requirió conocer cuál o cuáles son las bacterias que ejercían dicha significancia y para ello se empleó la prueba U de Mann-Whitney realizando las comparaciones a través de la combinación de parejas de bacterias (Anexo 3).

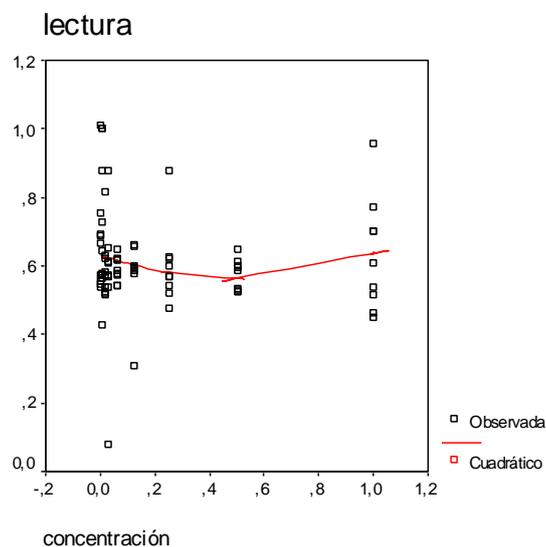
7.5.2 Estimación curvilínea, Correlación de Spearman y Regresión lineal

7.5.2.1 *Escherichia coli*. La estimación curvilínea para la lectura de la cepa *E. coli* vs. concentración, indicó que la ecuación cuadrática es la más significativa:

Dependent	Mth	Rsq	d.f.	F	Sigf	b0	b1
Lectura	QUA	,030	79	1,19	,031	,6315	,2752

$$\text{Lectura} = 0.6315 + (0.2752/\text{Concentración})$$

Figura 19 Curva de la ecuación cuadrática para la concentración vs. lectura de *E. coli*, para la secreción de las ranas colectadas en pastizal.



Se identificó que las concentraciones evaluadas no presentan actividad antimicrobiana para la cepa *E. coli* ATCC25922 al realizar la prueba Kruskal Wallis (Sig. asintót.: 0.733) (Tabla 7). Sin embargo, la ecuación cuadrática es la

que mejor se acomoda a la gráfica de la concentración vs. la lectura de *E. coli* a partir de la secreción de las ranas colectadas en pastizal (**Sig. 0.031**), en donde la lectura o el crecimiento de la bacteria disminuye hacia la concentración de 0.5 mg/ml, luego la curva asciende indicando el crecimiento del microorganismo a pesar del incremento en la concentración de las dosis (Figura 19). La regresión lineal a pesar de ser un método paramétrico se utilizó para observar el comportamiento de la curva resultado de la lectura vs. la concentración (Figura 20), indicando un leve descenso del crecimiento de la bacteria a medida que se utilizan las dosis más altas corroborando así, el resultado de la prueba Kruskal Wallis (Tabla 7) de la no existencia de actividad antimicrobiana. Del mismo modo, la correlación de Spearman indicó que existe un coeficiente de correlación débil, negativo (-0.143) y no significativo (Sig. bilateral 0.202) entre las concentraciones y sus correspondientes lecturas (Tabla 6).

Figura 20 Regresión lineal para la concentración vs. lectura de *E. coli*, para la secreción de las ranas colectadas en pastizal.

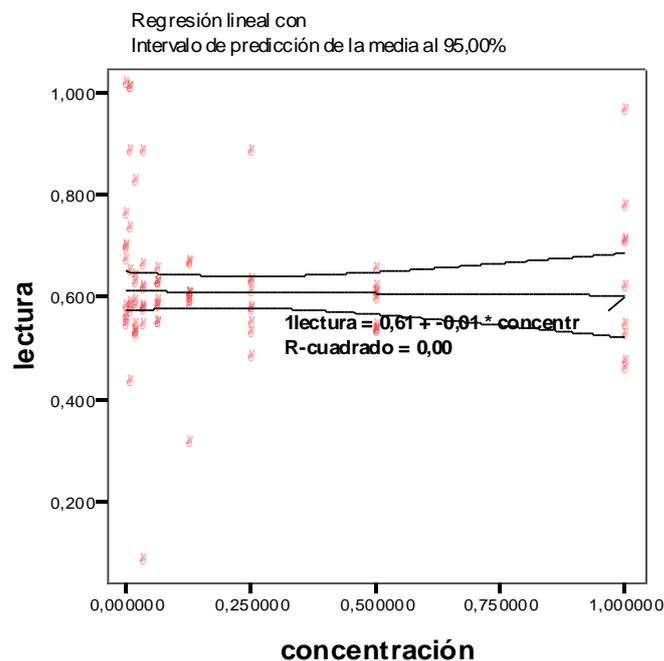


Tabla 6 Correlación de Spearman entre las concentraciones y las lecturas de *E. coli*, para la secreción de las ranas colectadas en pastizal.

Correlaciones			concentración	lectura
Rho de Spearman	concentración	Coeficiente de correlación	1,000	-,143
		Sig. (bilateral)	.	,202
		N	81	81
	lectura	Coeficiente de correlación	-,143	1,000
		Sig. (bilateral)	,202	.
		N	81	81

Tabla 7 Prueba Kruskal Wallis para determinar la diferencia significativa entre las concentraciones y la cepa *E. coli* a partir de la secreción cutánea de las ranas colectadas en pastizal. Resultado: No significativo.

Estadísticos de contraste: Concentración vs E. coli

	lectura
Chi-cuadrado	5,231
gl	8
Sig. asintót.	,733

a. Prueba de Kruskal-Wallis

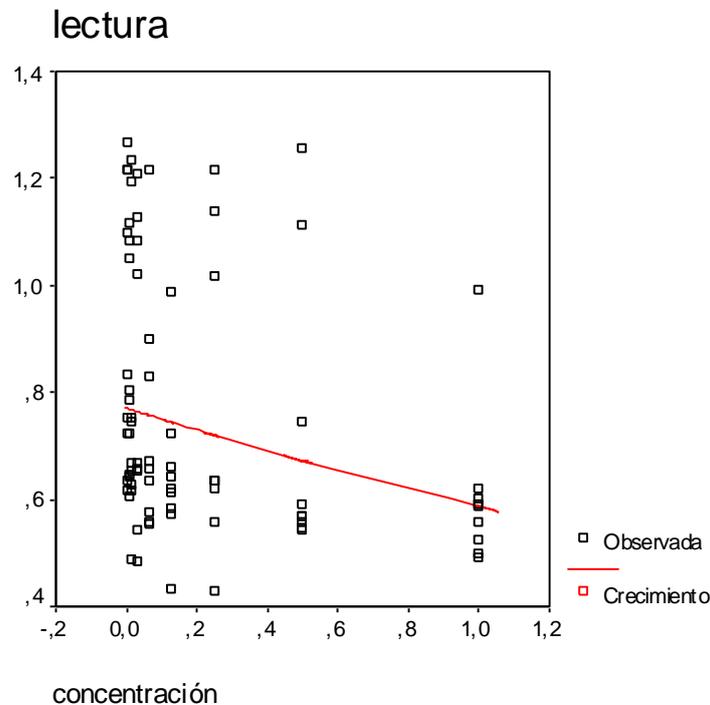
b. Variable de agrupación: concentración

7.5.2.2 *Pseudomonas aeruginosa*. La estimación curvilínea para la lectura de la cepa *P. aeruginosa*, indica una ecuación de crecimiento:

Dependent	Mth	Rsq	d.f.	F	Sigf	b0	b1
Lectura	GRO	,084	79	7,25	,009	-,2606	-,2726

$$\ln \text{Lectura} = - 0.2606 + (- 0.2726 \times \text{Concentración})$$

Figura 21 Curva de la ecuación crecimiento para la concentración vs. lectura de *P. aeruginosa*, para la secreción de las ranas colectadas en pastizal.



La actividad antimicrobiana para la cepa *P. aeruginosa* ATCC27853 se confirmó luego de comparar las concentraciones frente a la bacteria a través de la prueba Kruskal Wallis (Sig. asintót. 0.033) (Tabla 9). Con la prueba a posteriori U de Mann Whitney se examinaron a través de parejas de concentraciones todas las combinaciones de estas, obteniendo los valores más significativos para la concentración de 1 mg/ml vs 0 mg/ml (Sig. asintót.: 0.002) y 0.5 mg/ml vs 0.00781 mg/ml (Sig. asintót.: 0.003), y esto se atribuye a que son comparaciones entre las concentraciones más alta y más baja, además de aquella en donde la concentración de secreción es igual a cero; otras comparaciones por medio de la misma prueba muestran que se esperaría encontrar que al evaluar concentraciones por encima de 0.125 mg/ml se obtenga mayor inhibición para la bacteria *P. aeruginosa*, mientras que las concentraciones de 0.03125, 0.0156 y 0.00781 mg/ml no causaron efecto antibacteriano.

La ecuación matemática con mayor valor significativo para la curva resultado de la gráfica concentración vs. lectura es la ecuación crecimiento (**Sigf. 0.009**), mostrando una curva con valores cada vez más bajos de crecimiento a medida que se incrementa la concentración (Figura 21), como también se evidencia

con la regresión lineal (Figura 22) y el valor significativo (Sig. bilateral 0.000) y débil (-0.431) del coeficiente de correlación de Spearman (Tabla 8).

Figura 22 Regresión lineal para la concentración vs. lectura de *P. aeruginosa*, para la secreción de las ranas colectadas en pastizal.

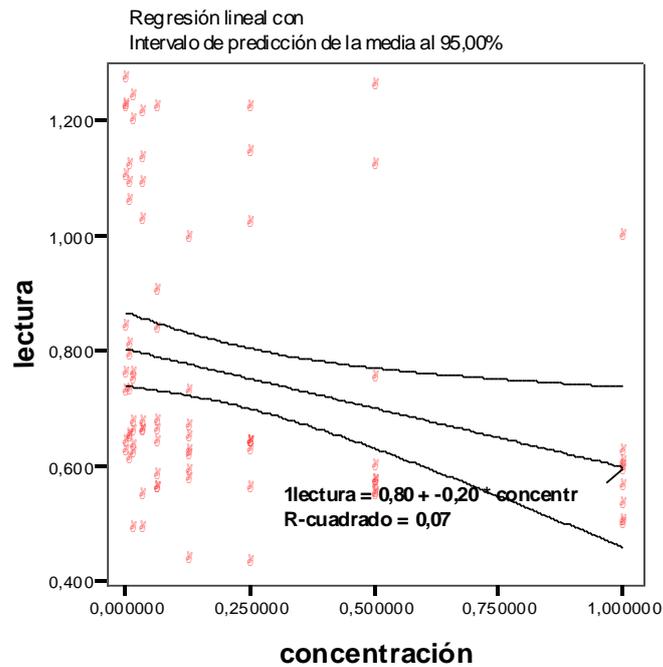


Tabla 8 Correlación de Spearman entre las concentraciones y las lecturas de *P. aeruginosa*, para la secreción de las ranas colectadas en pastizal.

Correlaciones

			concentración	lectura
Rho de Spearman	concentración	Coeficiente de correlación	1,000	-,431**
		Sig. (bilateral)	.	,000
		N	81	81
	lectura	Coeficiente de correlación	-,431**	1,000
		Sig. (bilateral)	,000	.
		N	81	81

** . La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

Tabla 9 Prueba Kruskal Wallis para determinar la diferencia significativa entre las concentraciones y la cepa *P. aeruginosa* a partir de la secreción cutánea de las ranas colectadas en pastizal. Resultado: Significativo.

Estadísticos de contraste: Concentración vs *P. aeruginosa*

	lectura
Chi-cuadrado	16,711
gl	8
Sig. asintót.	,033

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: concentración

7.5.2.2.1 Concentración Inhibitoria Mínima. La lectura del control positivo que indicó un 100% de crecimiento de *P. aeruginosa* es el promedio 0,928, por lo que la lectura que indica un 50% de crecimiento bacteriano es la lectura 0,464; por tanto para determinar por extrapolación el valor de la concentración en donde solo la mitad de las bacterias crecen (CIM), se toma la ecuación lineal identificada a partir de la estimación curvilínea, despejando la variable concentración y reemplazando el valor 0.464 (50% de crecimiento bacteriano) en el término **lectura**:

$$\ln \text{Lectura} = -0.2606 + (-0.2726 \times \text{Concentración})$$

$$\text{Concentración} = \frac{\ln \text{lectura} - (-0.2606)}{-0.2726}$$

$$\text{Concentración} = \frac{\ln 0.4644 - (-0.2606)}{-0.2726}$$

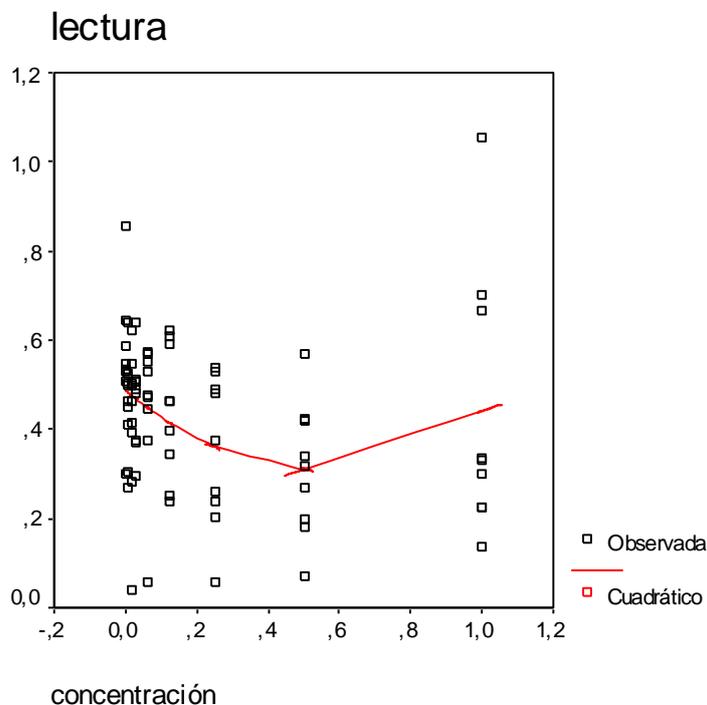
$$\text{CIM} = 1.85 \text{ mg/ml}$$

7.5.2.3 *Staphylococcus aureus*. La estimación curvilínea para la lectura de la cepa *S. aureus*, indica una ecuación cuadrática:

Dependent	Mth	Rsqr	d.f.	F	Sigf	b0	b1	b2
Lectura	QUA	,107	78	4,66	,012	,4873	-,6591	,6133

$$\text{Lectura} = 0.487 - 0.6591 \times \text{Concentración} + 0.6133 \times \text{Concentración}^2$$

Figura 23 Curva de la ecuación cuadrática para la concentración vs. lectura de *S. aureus*, para la secreción de las ranas colectadas en pastizal.



Se demostró estadísticamente que no existe actividad antimicrobiana para la cepa *S. aureus* ATCC25923 luego de comparar las concentraciones y lecturas a través de la prueba Kruskal Wallis y que presenta un valor no significativo (Sig. asintót.: 0.083) (Tabla 11), a pesar de ello, la ecuación cuadrática es la que mejor describe el comportamiento de la curva de la concentración vs. la lectura para *S. aureus*, señalando que el crecimiento de esta bacteria disminuye hacia la concentración de 0.5 mg/ml, así mismo, la concentración más alta (1 mg/ml) y más baja (0.00781 mg/ml) presentan los valores más altos de lectura y por tanto los más desfavorables en cuanto a inhibición del crecimiento bacteriano (Figura 23). Este resultado no es concordante con la regresión lineal (Figura 24), en donde se observa una gráfica casi paralela al eje de la variable concentración y con una ligera tendencia a disminuir el valor de la lectura o desarrollo bacteriano a medida que la línea se acerca a las concentraciones más altas, tal como sucede con la correlación de Spearman (Tabla 10) cuyo resultado indica que existe un coeficiente de correlación débil (-0.322) y significativo (Sig. bilateral 0.003).

Figura 24 Regresión lineal para la concentración vs. lectura de *S. aureus*, para la secreción de las ranas colectadas en pastizal.

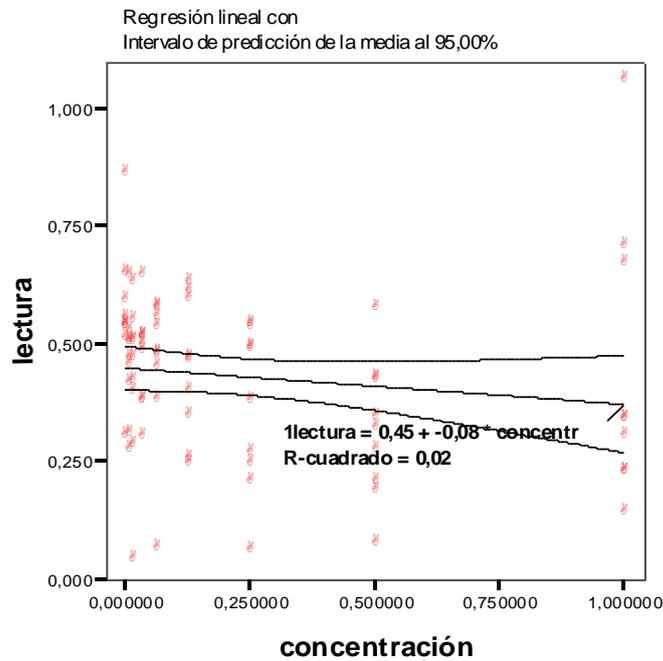


Tabla 10 Correlación de Spearman entre las concentraciones y las lecturas de *S. aureus*, para la secreción de las ranas colectadas en pastizal.

Correlaciones

			concentración	lectura
Rho de Spearman	concentración	Coeficiente de correlación	1,000	-,322**
		Sig. (bilateral)	.	,003
		N	81	81
	lectura	Coeficiente de correlación	-,322**	1,000
		Sig. (bilateral)	,003	.
		N	81	81

** . La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

Tabla 11 Prueba Kruskal Wallis para determinar la diferencia significativa entre las concentraciones y la cepa *S. aureus* a partir de la secreción cutánea de las ranas colectadas en pastizal. Resultado: No significativo.

Estadísticos de contraste: Concentración vs. *S. aureus*^a

	lectura
Chi-cuadrado	13,956
gl	8
Sig. asintót.	,083

- a. Prueba de Kruskal-Wallis
- b. Variable de agrupación: concentración

7.6 EFECTO DE LA SECRECION CUTÁNEA DE LAS RANAS COLECTADAS EN RASTROJO

7.6.1 Efecto de la secreción cutánea de las ranas colectadas en rastrojo sobre las cepas bacterianas. El resultado de la comparación de la lectura vs. las cepas bacterianas a través de la prueba Kruskal Wallis reveló que hay una alta diferencia estadística (Sig. asintót. 0.000) (Tabla 12).

Tabla 12 Prueba Kruskal Wallis para la comparación de la lectura vs. cepas bacterianas, a partir de la secreción cutánea de las ranas colectadas en rastrojo.

Rangos

	bacterias	N	Rango promedio
lectura	E. coli	81	145,94
	P. aeruginosa	81	168,56
	S. aureus	81	51,49
	Total	243	

Estadísticos de contraste^{a,b}

	lectura
Chi-cuadrado	126,437
gl	2
Sig. asintót.	,000

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: bacterias

Dado esto, se realizaron pruebas a posteriori para determinar cuál o cuáles son las bacterias que son diferentes estadísticamente (Anexo 4).

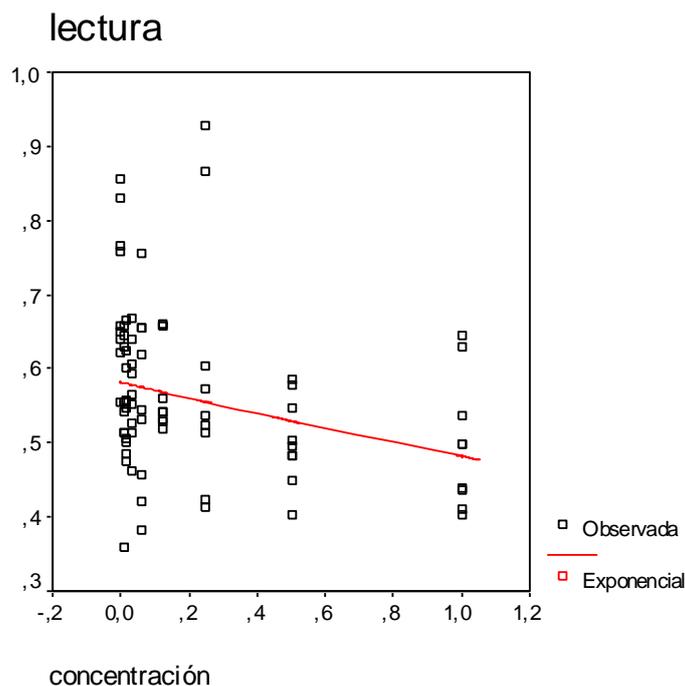
7.6.2 Estimación curvilínea, Correlación de Spearman y Regresión lineal

7.6.2.1 *Escherichia coli*. La estimación curvilínea para la lectura de la cepa *E. coli*, indica una ecuación exponencial:

Dependent	Mth	Rsq	d.f.	F	Sigf	b0	b1
Lectura	EXP	,100	79	8,79	,004	,5818	-,1890

$$Lectura = 0.581 \times e^{(-0.189 \times Concentración)} \quad \text{ó} \quad \ln(Lectura) = 0.581 - 0.189 \times Concentración$$

Figura 25 Curva de la ecuación exponencial para la concentración vs. lectura de *E. coli*, para el rastreo.



Para el caso de la secreción de las ranas colectadas en rastrojo y en particular para la cepa *E. coli* se determinó la actividad antimicrobiana dado que $p < 0.05$ (Tabla 14) al momento de comparar la lectura con la cepa, posterior a ello se concluye que las concentraciones de 1 y 0.5 mg/ml son las que presentan mayores diferencias estadísticas (Sig. asintót. 0.002 y 0.001 respectivamente) y por tanto son las que tienen mayor actividad antimicrobiana para *E. coli* ATCC25922 luego de aplicar la prueba U de Mann Whitney.

Se estableció que al evaluar las concentraciones altas de secreción cutánea existe menor proliferación de la cepa lo que se traduce en mayor efectividad antimicrobiana luego de determinar que la ecuación matemática de mayor significancia es la exponencial (Sigf. 0,004) (Figura 25), donde la interpretación tanto de su curva (Figura 25), correlación de Spearman con un valor de correlación negativo (-0.385) y significativo (Sig. bilateral 0.000) (Tabla 13), además de la regresión lineal (Figura 26) conllevan a dicho planteamiento.

Figura 26 Regresión lineal para la concentración vs. lectura de *E. coli*, para la secreción de las ranas colectadas en rastrojo.

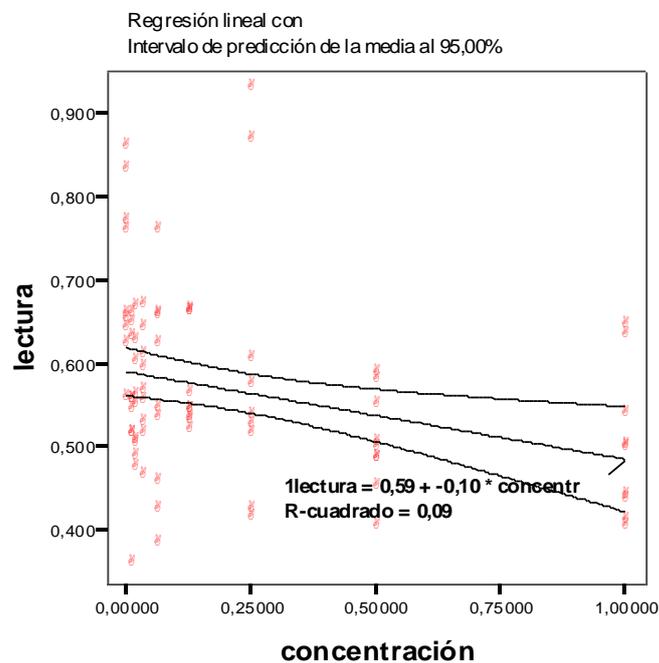


Tabla 13 de Spearman entre las concentraciones y las lecturas de *E. coli*, para la secreción de las ranas colectadas en rastrojo.

			concentración	lectura
Rho de Spearman	concentración	Coeficiente de correlación	1,000	-,385**
		Sig. (bilateral)	.	,000
		N	81	81
	lectura	Coeficiente de correlación	-,385**	1,000
		Sig. (bilateral)	,000	.
		N	81	81

** . La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

Tabla 14 Prueba Kruskal Wallis para determinar la diferencia significativa entre las concentraciones y la cepa *E. coli* a partir de la secreción cutánea de las ranas colectadas en rastrojo. Resultado: Significativo.

Estadísticos de contraste: Concentración vs *E. coli*

	lectura
Chi-cuadrado	20,553
gl	8
Sig. asintót.	,008

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: concentración

7.6.2.1.1 Concentración Inhibitoria Mínima. Se procedió de manera similar como en el caso de *P. aeruginosa* a partir de la secreción de la población del pastizal. Para este caso el valor de la lectura que indica un 100% de crecimiento es 0,703 y la mitad de este valor revela un 50% de crecimiento que equivale a 0,351. Se procede a despejar y reemplazar en la ecuación exponencial.

$$\ln(\text{Lectura}) = 0.581 - 0.189 \times \text{Concentración}$$

$$\text{Concentración} = \frac{\ln(\text{Lectura}) - 0.5818}{-0.189}$$

$$\text{Concentración} = \frac{\ln(0.351) - 0.5818}{-0.189}$$

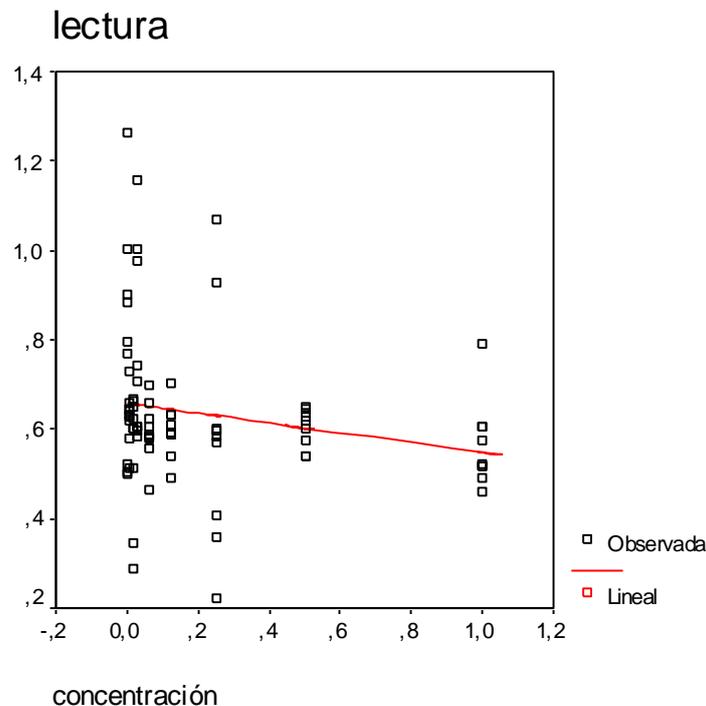
$$\text{CIM} = 8.61 \text{ mg/ml}$$

7.6.2.2 *Pseudomonas aeruginosa*. La estimación curvilínea para la lectura de la cepa *P. aeruginosa*, indica que la ecuación lineal es la de mayor significancia estadística:

Dependent	Mth	Rsq	d.f.	F	Sigf	b0	b1
Lectura	LIN	,041	79	3,38	,070	,6579	-,1100

$$\text{Lectura} = 0.657 - 0.11 \times \text{Concentración}$$

Figura 27 Curva de la ecuación lineal para la concentración vs. lectura de *P. aeruginosa*, para el rastrojo.



La no existencia de actividad antimicrobiana para *P. aeruginosa* queda establecida con el resultado no significativo (Sig. asintót. 0.094) (Tabla 16) de la prueba Kruskal Wallis luego de confrontar la concentración y la cepa.

La estimación curvilínea para el caso de *P. aeruginosa* a partir de la lectura y concentración de la secreción de las ranas procedentes de rastrojo, estableció que estadísticamente ninguna ecuación matemática se ajusta a la grafica

lectura vs. concentración, no obstante se presenta la gráfica de la ecuación lineal (Figura 27) como la más cerca de ser significativa con un valor de **0.07**.

La asociación entre las concentraciones y las lecturas es significativa (Sig. bilateral 0.007) y negativa no perfecta (-0.296) (Tabla 15), también se muestra la gráfica de regresión lineal (Figura 28).

Figura 28 Regresión lineal para la concentración vs. lectura de *P. aeruginosa*, para la secreción de las ranas colectadas en rastrojo.

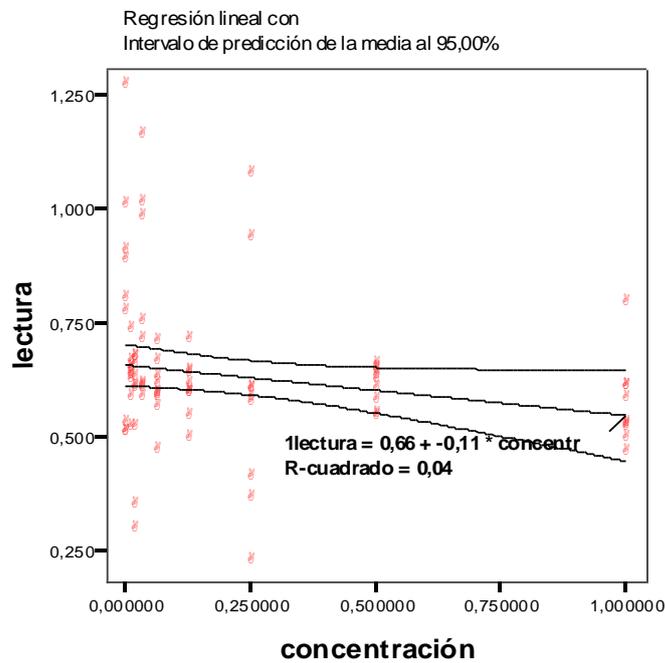


Tabla 15 Correlación de Spearman entre las concentraciones y las lecturas de *P. aeruginosa*, para la secreción de las ranas colectadas en rastrojo.

Correlaciones			concentración	lectura
Rho de Spearman	concentración	Coeficiente de correlación	1,000	-,296**
		Sig. (bilateral)	.	,007
		N	81	81
	lectura	Coeficiente de correlación	-,296**	1,000
		Sig. (bilateral)	,007	.
		N	81	81

** . La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

Tabla 16 Correlación de Spearman entre las concentraciones y las lecturas de *P. aeruginosa*, para la secreción de las ranas colectadas en rastrojo.

Estadísticos de contraste: Concentración vs *P. aeruginosa*

	lectura
Chi-cuadrado	13,549
gl	8
Sig. asintót.	,094

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: concentración

7.6.2.3 *Staphylococcus aureus*. La estimación curvilínea para la lectura de la cepa *S. aureus*, indica una ecuación exponencial:

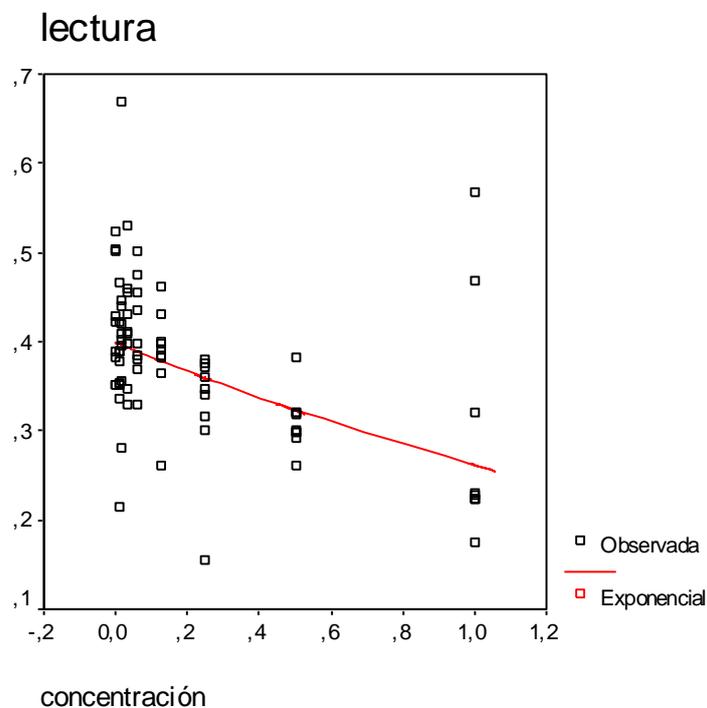
Dependent	Mth	Rsq	d.f.	F	Sigf	b0	b1
Lectura	EXP	,273	79	29,65	,000	,3991	-,4225

$$Lectura = 0.399 \times e^{(-0.4225 \times Concentración)}$$

Ó

$$\ln(Lectura) = 0.399 - 0.4225 \times Concentración$$

Figura 29 Curva de la ecuación exponencial para la concentración vs. lectura de *S. aureus*, para el rastrojo.



La actividad antimicrobiana se determinó con la prueba Kruskal Wallis luego de obtener un resultado con alta diferencia significativa (Sig. asintót.: 0.000) (Tabla 18) al comparar la concentración frente a la cepa *S. aureus*.

El valor de mayor significancia estadística en la estimación curvilínea es la ecuación matemática exponencial (**Sigf. 0.000**) (Figura 29); la interpretación de la regresión lineal (Figura 30) y la correlación de Spearman (Tabla 17) señalaron que existe un considerable descenso del crecimiento de la bacteria al utilizar las dosis más fuertes como lo indica las comparaciones de la prueba U de Mann Whitney (Sig. asintót.: 0.001).

Figura 30 Regresión lineal para la concentración vs. lectura de *S. aureus*, para la secreción de las ranas colectadas en rastrojo.

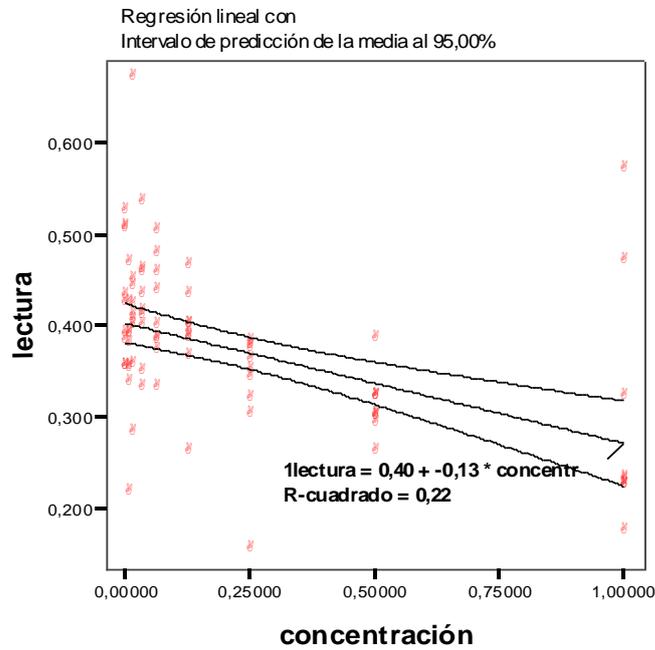


Tabla 17 Correlación de Spearman entre las concentraciones y las lecturas de *S. aureus*, para la secreción de las ranas colectadas en rastrojo.

Correlaciones

			concentración	lectura
Rho de Spearman	concentración	Coeficiente de correlación	1,000	-,472**
		Sig. (bilateral)	.	,000
		N	81	81
	lectura	Coeficiente de correlación	-,472**	1,000
		Sig. (bilateral)	,000	.
		N	81	81

** . La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

Tabla 18 Prueba Kruskal Wallis para determinar la diferencia significativa entre las concentraciones y la cepa *S. aureus* a partir de la secreción cutánea de las ranas colectadas en rastrojo. Resultado: Significativo.

Estadísticos de contraste: Concentración vs *S. aureus*^a

	lectura
Chi-cuadrado	29,644
gl	8
Sig. asintót.	,000

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: concentración

7.6.2.3.1 Concentración Inhibitoria Mínima. Para este caso, la lectura que muestra un 100% de crecimiento es el valor 0,426 y el 50% de crecimiento está reflejado por el valor 0,213; se procede a despejar y reemplazar para obtener el valor CIM.

$$\ln(\text{Lectura}) = 0.399 - 0.4225 \times \text{Concentración}$$

$$\text{Concentración} = \frac{\ln(\text{Lectura}) - 0.3991}{-0.4225}$$

$$\text{Concentración} = \frac{\ln(0.213) - 0.3991}{-0.4225}$$

$$\text{CIM} = 4.60 \text{ mg/ml}$$

8. DISCUSIÓN

El olor y sabor amargo de la secreción frente a una situación de estrés seguramente hace parte de una estrategia antipredatoria de *D. columbianus*, como el caso de las ranas coloreadas pertenecientes a la familia Dendrobatidae donde se ha identificado componentes útiles como defensa química antipredatoria (Daly *et al.* 2003) y esto como resultado de la presión sobre la presa que por evolución han obtenido mecanismos de defensa como las sustancias tóxicas y nocivas (Darst *et al.* 2005); sin embargo a la fecha y para el género *Dendropsophus* no existen trabajos publicados respecto a la secreción como un mecanismo antipredatorio.

Estadísticamente las lecturas correspondientes a la turbidez que indican el crecimiento bacteriano en presencia de secreción cutánea no se ajustan a la distribución normal (Kolmogorov-Smirnov; $p < 0.05$) (Tabla 1), la distribución de sus varianzas no son homocedásticas (Levene; $p < 0.05$) (Tabla 2) y la diferencia estadística entre los bloques es significativa marginal (sig. asintót. 0,05) (Tabla 3), indicando para este último caso que las condiciones en las que se trabajó cada placa de Elisa con sus respectivos bloques no fueron idénticas; los resultados para estos tres aspectos se atribuyen principalmente a las mínimas repeticiones estadísticas de cada concentración por bloque y para cada bacteria. Las correcciones a estos eventos para obtener datos con distribución normal y varianzas homogéneas con el propósito de aplicar pruebas paramétricas sin desmeritar la potencia de las pruebas no paramétricas, son el aumento de repeticiones para cada tratamiento en cada bloque y el control estricto de covariables o variables externas del experimento como lo es la temperatura; sin olvidar que el experimento debe ser ejecutado por el mismo investigador.

8.1 RELACIÓN ENTRE LA PROCEDENCIA DE LAS RANAS Y EL EFECTO SOBRE EL CRECIMIENTO MICROBIANO

La actividad biológica de la secreción cutánea varió dependiendo del sitio de procedencia frente al crecimiento las tres bacterias según la prueba Kruskal Wallis (Tabla 4), hecho que se demuestra con la determinación antimicrobiana de una sola cepa (*P. aeruginosa*) para el caso de la población del pastizal y de dos cepas (*E. coli* y *S. aureus*) para la población del rastrojo. Al ser sitios de colecta diferentes desde el punto de vista de alteración y específicamente a

través de coberturas o estratos vegetales, se puede inferir que entre un sitio y otro existen cambios cuantitativos de las variables ambientales, tales como la temperatura del agua y del suelo, humedad relativa, luminosidad; además de cambios en parámetros fisicoquímicos del agua como la demanda de oxígeno, pH, nitratos, salinidad y fosfatos que conllevan al cambio microbiológico del agua que pueden favorecer la proliferación de bacterias quimilitotróficas, quimiorganotróficas, osmotolerantes, acidófilas, neutrófilas, alcalófilas, psicrófilas, mesófilas, termófilas, aerobios obligados, anaerobios facultativos, anaerobios aerotolerantes, anaerobios obligados o microaerofilos (Prescott *et al.* 2002); por tanto, como el agua es finalmente el recurso con el cual la rana presenta mayor interacción, las dos poblaciones estarían expuestas a diferentes microorganismos y abundancias de los mismos, donde las ranas posiblemente adquirieran mayor especificidad y potencia contra un determinado microorganismo agresor ya sea a través de una mutación o estimulación para la síntesis de un péptido antimicrobiano (Weinberg *et al.* 1998 y Vanhoye *et al.* 2003).

El crecimiento de las cepas ATCC evaluadas presentan valores altamente significativos (Sig. asintót. 0.000) a través de la prueba Kruskal Wallis tanto al ser tratadas con la secreción de los individuos provenientes de pastizal (Tabla 5) como los de rastrojo (Tabla 12), así mismo, a través de la prueba U de Mann de Whitney (Anexo 3 y Anexo 4) se identificó que las diferentes concentraciones de los dos tipos de secreción producen efectos de inhibición dependiendo de la cepa. Esto se consideraría normal, pues las bacterias *E. coli*, *P. aeruginosa* (Gram negativas) y *S. aureus* (Gram positiva) son diferentes (Núñez *et al.* 2008, Prescott *et al.* 2002), con metabolismos diferentes, acervo genético propio y causantes de particularidades específicas (Soberón 2001, Rodríguez 2002, Forbes *et al.*, 2004, Batlle *et al.* 2005, Brook *et al.* 2005, Mamani *et al.* 2006, Martínez *et al.* 2007) que presentan diferente reacción ante la secreción anura.

8.2 SECRECIÓN CUTÁNEA DE LAS RANAS COLECTADAS EN PASTIZAL

8.2.1 Concentración Inhibitoria Mínima *Pseudomonas aeruginosa*. Con los resultados de las lecturas no se logró determinar directamente la CIM para la cepa *P. aeruginosa*, cepa en la cual se determinó la actividad antimicrobiana, por tanto, se realizó una extrapolación a partir de la ecuación matemática obtenida por la estimación curvilínea, resultando de ello una CIM = 1.85 mg/ml,

el valor de r^2 (Rsq) para la ecuación es de 0.084, por tanto se puede decir que solo un 8.4% de la variación en la concentración se relaciona con el cambio del crecimiento bacteriano, como se puede ver, se trata de un porcentaje pequeño de relación entre las dos variables por tanto el valor de CIM obtenido puede estar errado en un 91.6%, este alto valor de incertidumbre se discute más adelante junto a los otros valores obtenidos.

8.3 SECRECIÓN CUTÁNEA DE LAS RANAS COLECTADAS EN RASTROJO

8.3.1 Concentración Inhibitoria Mínima *Escherichia coli*. Se realizó una extrapolación a partir de la ecuación matemática exponencial obtenida por estimación curvilínea, resultando una CIM = 8.61 mg/ml, el valor de r^2 (Rsq) para la ecuación es de **0.100**, por tanto un 10% de la variación en la concentración se relaciona con la variación del crecimiento bacteriano, como en el caso anterior, se trata de un porcentaje pequeño de relación entre las dos variables y existe un alto porcentaje de que la relación no sea cierta.

8.3.2 Concentración Inhibitoria Mínima *Staphylococcus aureus*. A partir de la ecuación exponencial se realizó la extrapolación de la CIM obteniendo un valor de 4.60 mg/ml. El valor de r^2 (Rsq) para la ecuación equivale a **0.273** y el 27.3% de la variación en la concentración está relacionada con el cambio del crecimiento bacteriano, como en los dos casos anteriores de determinación de CIM, un valor equivalente al 72.7% determina que la relación no sea cierta.

Los bajos valores de r^2 para los tres casos en donde se determinó la actividad antimicrobiana tanto para la población del pastizal y rastrojo, pueden ser resultado de la distribución no normal y la no homogeneidad de varianzas de los valores de las lecturas. Otro factor importante que puede influenciar el valor r^2 es la utilización de la secreción cruda total en donde posiblemente existan, como se ha descubierto en otras secreciones, aparte de péptidos con actividad antimicrobiana, otras moléculas con diferentes actividades biológicas (Brand *et al.* 2006, Conceição *et al.* 2007) que interfieran con la acción e interacción de los péptidos antimicrobianos con las cepas bacterianas, haciendo referencia en últimas a la pared y membrana celular, estructuras donde se ha demostrado que los péptidos aislados de secreciones cutáneas de anuros, tienen su actividad (Nascimento *et al.* 2003, Pukala *et al.* 2006, Yount *et al.* 2006); otra explicación a los altos valores de CIM y bajos valores de r cuadrado en los tres casos donde se determina la actividad, posiblemente indican que los péptidos

que se encuentran en las dos poblaciones de *D. columbianus* presentan una baja carga neta positiva que no permite la atracción electrostática e inserción de los péptidos en las membranas de las bacterias, pues se ha evaluado que diferentes péptidos antimicrobianos con alta carga positiva pueden ser cinco o diez veces más activos (Weinberg *et al.* 1998). Adicional a ello, las secreciones son mezclas complejas compuestas por moléculas biológicamente activas, una de esas actividades es la antibiótica demostrada en péptidos totalmente purificados de secreciones cutáneas donde se destaca su arreglo estructural para penetrar en la membrana celular bacteriana, esto principalmente por la conformación de alfa hélice y la presencia de regiones específicas de aminoácidos que reconocen la membrana bacteriana, ya al evaluar toda la secreción de *D. columbianus* dichas regiones específicas pueden estar compitiendo con regiones específicas propias de otras moléculas de la secreción cutánea que dificultan dicho reconocimiento.

Se obtuvo que existe una relación dosis – efecto que demuestra la actividad antimicrobiana de la secreción cutánea total de las ranas provenientes del pastizal para la cepa *P. aeruginosa* ATCC27853 y de la secreción cutánea de las ranas colectadas del rastrojo para las cepas *E. coli* ATCC25922 y *S. aureus* ATCC25923. Es interesante ver como las cepas presentan comportamientos diferentes frente a las concentraciones evaluados; por ejemplo, para *E. coli* y *P. aeruginosa* que son bacterias Gram negativas, se hubiera esperado la determinación de la actividad antimicrobiana simultáneamente a partir de las secreciones de las dos poblaciones. El rechazo de esta suposición o hipótesis permite formular que las secreciones cutáneas de las dos poblaciones de *D. columbianus* se comportan con diferente afinidad y potencia contra determinados microorganismos, tal como lo menciona Ohnuma *et al.* (2007) para la clase Amphibia.

Con los resultados logrados, en donde la actividad antimicrobiana no se obtiene paralelamente para las tres cepas a partir de la secreción de las ranas de las dos poblaciones, también se permite hacer la aseveración de que en la piel de *D. columbianus* existen estructuras que reconocen el peligro potencial originado a través de las especies y concentraciones o abundancias de microorganismos patógenos, para luego liberar moléculas de acción específica, similar a lo obtenido por Mangoni *et al.* (2001) quienes a través del mantenimiento en cautiverio de dos grupos de *Rana esculenta*, una especie ampliamente distribuida en Italia, un primer grupo fue sometido a condiciones estériles, mientras que el segundo se mantuvo cautivo en condiciones de flora microbiana normal, se realizaron pruebas de susceptibilidad antimicrobiana concluyendo que las mantenidas en esterilidad disminuyen por lo menos 5 veces su actividad antimicrobiana frente a las del segundo grupo y después de

ser sometidas a su flora microbiana normal nuevamente presentan en su secreción concentraciones de péptidos que inhiben el crecimiento de dichas bacterias, postulando así, que en las glándulas granulares existen receptores que identifican microorganismos nocivos.

El reconocimiento de microorganismos patógenos y la carencia de un mecanismo que ayude a contrarrestar una posible infección, intoxicación o enfermedad ha conllevado a la teoría de la existencia de mutaciones generadoras de cambios en las secuencias de aminoácidos en las secreciones de aquellas ranas que colonizan nuevos nichos (Vanhoye *et al.* 2003 y Zasloff, 2009). Por tanto, con el análisis de los resultados obtenidos a partir de la prueba de microdilución en caldo, se deja planteado que para las muestras de las poblaciones objeto de estudio existen moléculas que inhiben el crecimiento de microorganismos que conviven con ellas y son capaces de generar perjuicio alguno, tal como se ha demostrado con el péptido antimicrobiano brevinin 2 de la rana norteamericana *Litobathes septentrionalis*, determinando su actividad contra aislamientos de los géneros *Pseudomonas*, *Serratia*, *Bacillus*, *Aeromonas*, *Burkholderia*, *Microbacterium* y *Delftia* obtenidos de su hábitat (Ashcroft *et al.* 2007) y que ratifica lo recientemente publicado por Woodhams *et al.* (2007) y Simmaco *et al.* (2009), notificando que los componentes de las secreciones cutáneas inhiben el crecimiento de los microorganismos que crecen en la superficie de las ranas.

En este orden de ideas, se podría asumir a la fecha de colecta la presencia de *P. aeruginosa* para el pastizal del Barrio Villa Elena y que los individuos de *D. columbianus* que allí habitan están siendo afectados por su patogenicidad o abundancia, mientras que *E. coli* y *S. aureus* están ausentes de este hábitat o no representan peligro alguno para la supervivencia de esta población.

P. aeruginosa se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, tanto en muestras de suelo, plantas, como en aguas prístinas y contaminadas, siendo causantes de cuadros infecciosos (Soberón 2001), además que poseer la capacidad de formar biopelículas (Prescott *et al.* 2002), por tanto, *D. columbianus* debe ostentar moléculas que le ayuden a contrarrestar la proliferación de esta, pues la sola formación de una biopelícula sobre su piel, afectaría las funciones vitales de ella y que garantizan en general la supervivencia de los anfibios (Stebbins y Cohen 1995 citado por Nascimento *et al.* 2003).

Para los individuos de la población ubicada en el rastrojo de los alrededores de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad del Cauca, se podría establecer que a la fecha de colecta se están valiendo de fracciones de la secreción cutánea para resguardarse de la presencia deletérea de *E. coli* y *S. aureus* mientras que *P. aeruginosa* no resulta perjudicial. Aunque *E. coli* y *S.*

aureus producen cuadros clínicos relacionados con infecciones y en el peor de los casos infecciones sistémicas (Mamani *et al.*2006) en el hombre, no se puede descartar que tales manifestaciones puedan presentarse en anuros como *D. columbianus*.

Aunque no existen reportes publicados del decline de los anfibios por parte de las cepas evaluadas, se ha identificado que *Aeromonas hydrophilia*, un patógeno Gram negativo es causante de la grave enfermedad red-leg (patas rojas) en poblaciones de anfibios del continente americano (Crawshaw 1992), lo que indicaría que a pesar que en las ranas existan mecanismos de defensa contra microorganismos patógenos, la repentina aparición o proliferación de estas puede conducir a enfermedades y pérdida de especies, tal como ha sucedido con el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis*, al cual se le atribuye la disminución de ciertas poblaciones de anfibios a causa de la Chitridiomicosis que ocasiona (Voyles *et al.* 2007).

Respecto a la efectividad antimicrobiana, no se logró realizar una determinación completa para cada secreción total de las ranas que provienen de los sitios de colecta, pues no existe actividad antimicrobiana simultánea para las tres cepas a partir de las dos secreciones crudas, si no que existe actividad antimicrobiana para *P. aeruginosa* a partir de la secreción de las ranas del pastizal y actividad antimicrobiana para *E. coli* y *S. aureus* a partir de la secreción de las ranas del rastrojo, por tanto se podría establecer que frente a las tres cepas objeto de estudio, la secreción cutánea de la población del rastrojo es más efectiva, pues inhibe el crecimiento de *E. coli* bacteria Gram negativa y *S. aureus* una bacteria Gram positiva.

Para los tres casos donde se determinó la actividad antimicrobiana se revela que la inhibición del crecimiento bacteriano está acompañada del incremento de la dosis de la secreción cutánea total, obteniendo que las concentraciones más altas son las que mayor efecto producen, hecho que se evidenció luego de incubar las placas a concentraciones más altas donde los pozos presentaron menor turbidez (Figura 31).

Figura 31 Pozos en los que se evidencia que la turbidez o crecimiento bacteriano disminuyen a medida que las concentraciones son más altas (Pozos de la izquierda).



Fot.: Coral, Edwin

La anterior situación dosis - efecto puede obedecer a las múltiples fracciones con diferente actividad que pueden existir en las secreciones totales obtenidas por electroestimulación de *D. columbianus*, donde su presencia no permiten la libre acción de uno o más péptidos antimicrobianos. Los altos valores de CIM (Tabla 19) detectados pueden ser resultado de lo mencionado al revisar los estudios efectuados a partir de las fracciones peptídicas provenientes de las secreciones totales de diferentes especies de anuros (Tabla 20 y 21) en donde evalúan las mismas especies de bacterias obteniendo bajos valores de CIM; por tanto se requiere realizar el fraccionamiento de las secreciones y evaluar los cortes que se obtengan, prediciendo un descenso significativo en los valores de CIM.

Tabla 19 Concentración inhibitoria mínima (CIM, mg/ml), para las cepas en las que se determinó actividad antimicrobiana.

	Pastizal	Rastrojo
<i>E. coli</i>	No se determinó	8.61
<i>P. aeruginosa</i>	1.85	No se determinó
<i>S. aureus</i>	No se determinó	4.60

Tabla 20 CIM (mg/ml) para péptidos aislados de secreciones de diferentes especies de anuros.

Péptido	PGLa	Mag 2	HSP 1	Aurein 1.1	Citropin 1.1	Maculatin 1.1	Caerin 1.1
Bacteria							
<i>E. coli</i>	0.032	0.064	0.032	>0.1	>0.1	>0.1	>0.1
<i>P. aeruginosa</i>	0.128	0.128	0.064	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	0.064	0.256	0.003	0.05	0.012	0.012	0.012

Tomado y modificado de: Prates *et al.* 2004, Lohner y Prossnigg 2009 y Fernández, Gehman y Separovic 2009.

Finalmente, la ciencia con sus evidencias se convierte en una herramienta de confianza con la que se puede involucrar a la sociedad con los procesos de investigación, sensibilizándolos y comprometiéndolos con la preservación de los recursos naturales; así, si las personas de una localidad conviven con una determinada especie de rana en cuya secreción cutánea se encuentran determinados péptidos antimicrobianos, podrían llegar a conservarla al igual que su hábitat, en estos casos no se trata de ir detrás de una patente que llegue a cuentas de unos pocos, sino que beneficien a la sociedad en general.

Tabla 21 Péptidos antimicrobianos, especies y procedencia.

Péptido	Especie	Procedencia de la especie
PGLa, Mag2	<i>Xenopus</i> sp.	África
HSP1	<i>Hyla punctata</i>	Norte de Brasil
Aurein	-	Australia
Citropin	<i>Litoria citropa</i>	
Maculatin	<i>Litoria genimaculata</i>	
Caerin 1.1	<i>Litoria splendida</i>	

9. CONCLUSIONES

Se determinó la actividad antimicrobiana en la cepa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 y un valor de concentración inhibitoria mínima (CIM) igual a 1.85 mg/ml a partir de la secreción cutánea de los individuos de una población de *Dendropsopus columbianus* procedentes de un pastizal en el barrio Villa Elena en el municipio de Popayán-Cauca.

Igualmente, se determinó la actividad antimicrobiana en la cepa *Escherichia coli* ATCC25922 con un valor CIM igual a 8.61 mg/ml y un valor de CIM igual a 4.60 mg/ml en la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC25923 a partir de la secreción cutánea de los individuos de una población de *D. columbianus* procedentes de un rastrojo en los alrededores de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad del Cauca en las afueras del municipio de Popayán-Cauca.

Los valores de CIM son altos al confrontarse con otros trabajos en donde se evalúan péptidos o fracciones de secreciones cutáneas de otras especies de ranas, dichos valores en *D. columbianus* se pueden atribuir a la evaluación de la secreción total en donde seguramente las moléculas que la constituyen interfieren con la atracción de las membranas acterianas.

Los resultados de la prueba Kruskall Wallis demuestran que hay diferencia significativa entre las poblaciones, por tanto, las secreciones producen resultados de inhibición diferentes en las cepas.

Los sitios de procedencia de las dos poblaciones son diferentes desde el punto de vista de coberturas vegetales, hecho que promueve la modificación de variables ambientales y microbiológicas del agua que favorecen la presencia y proliferación de diferentes microorganismos que pueden afectar a *D. columbianus*.

Dado que las secreciones de las dos poblaciones producen resultados de inhibición diferentes, indirectamente se corrobora que las ranas presentan mecanismos que les permiten identificar abundancias y cepas potencialmente patógenas con el objetivo de contrarrestar la posterior invasión y patologías que provocan.

La inhibición del crecimiento bacteriano está correlacionada con la utilización de las concentraciones más altas.

Se estandarizó un método de electroestimulación para *D. columbianus* con el objetivo de obtener su secreción cutánea.

Para el grupo de Investigaciones Herpetológicas y Toxinológicas (GIHT) y el Laboratorio de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias de la salud de la Universidad del Cauca, se estandariza la prueba de susceptibilidad antimicrobiana microdilución en caldo para fuentes animales con potencial actividad antimicrobiana.

10. RECOMENDACIONES

Es conveniente extender este tipo de investigaciones con aplicaciones biotecnológicas como espermicida, hemolítica, anticáncer, antiparásitarias, antiviral, entre otras, hacia diferentes venenos y secreciones producidos por grupos de fauna con distribución en el Cauca y Suroccidente Colombiano.

Continuar realizando evaluaciones con el objetivo de determinar si la secreción cutánea de *Dendropsophus columbianus* presenta actividad antimicótica o antifúngica, inclusive antimosquito.

Realizar una caracterización microbiológica de los cuerpos de agua en donde se encuentran poblaciones de *Dendropsophus columbianus* y compararlos con su actividad antimicrobiana.

Realizar la fragmentación de la secreción cutánea de *Dendropsophus columbianus*, aislar y secuenciar sus péptidos con el objetivo de identificar aquel o aquellos que presenten actividad antimicrobiana.

11. LITERATURA CITADA

ANGULO, Ariadne, ALMONACID Rueda José Vicente, MAHECHA Rodríguez José Vicente y LA MARCA Enrique. Técnicas de Inventario y Monitoreo para los Anfibios de la Región Tropical Andina, Conservación Internacional, Serie Manuales de Campo N°.2, Bogotá D.C, Panamericana Formas e Impresos S.A., 298 p.

ASHCROFT, Jonathan W., ZALINGER Zachary B., BEVIER Catherine R. y FEKETE Frank A., 2007. Antimicrobial properties of two purified skin peptides from the mink frog (*Rana septentrionalis*) against bacteria isolated from the natural habitat. En: Comparative Biochemistry and Physiology Part C 146, 325–330 p.

BATISTA, F. Cesar, SCALONI Andrea, RIGDEN Daniel J., SILVA Lindomar R., ROMERO Adela Rodríguez, DUKOR Rina, SEBBEN Antonio, TALAMO Fabio y BLOCH Carlos, 2001. A novel heterodimeric antimicrobial peptide from the tree-frog *Phyllomedusa distincta*. En: Federation of European Biochemical Societies, no. 494, 85-89 p.

BATLLE, María del Carmen, DICKINSON Félix, MONRÁS Miriam Pérez, MARTÍNEZ Isis Tamargo y SIMILIS Alexis, 2005. Meningitis bacteriana y *Pseudomonas aeruginosa*: a propósito de un caso. En: Rev. Cubana Med. Trop., vol. 57, no.3.

BLAUSTEIN A. R., BLAUSTEIN Andrew R., HOFFMANT Peter D., HOKIT D. Grant, KIESECKER Joseph M., WALLS Susan C. y HAYS John B., 1994. UV repair and resistance to solar UV-B in amphibian eggs: a link to population declines? En: Proc. Natl Acad Sci USA, 91, 1791-1795 p.

BOLÍVAR, García Wilmar y RENJIFO Juan Manuel, 2004. *Dendropsophus columbianus*. In: IUCN, Red List of Threatened Species. <<http://www.iucnredlist.org/>>. Downloaded on 19 December 2008.

BRAND, Guilherme D., LEITE José Roberto, SILVA Lusiano, ALBUQUERQUE Sergio, PRATES Maura V., AZEVEDO Ricardo, CARREGARO Vanessa, SILVA Joao S., SÁ Vanuza C. L., BRANDAO Reuber A. y BLOCH Jr Carlos, 2002. Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distincta*. En: The Journal of Biological Chemistry, vol. 277, no. 51, 49332–49340 p.

BRAND Guilherme D., LEITE José Roberto S. A., MANDEL Saulo Martins de Sá, MESQUITA Darlan A., SILVA Luciano P., PRATES Maura V., BARBOSA Eder A., VINECKY Felipe, MARTINS Graciella R., GALASSO Joao Henrique, KUCKELHAUS Selma A.S., SAMPAIO Raimunda N. R., FURTADO José R. Jr., ANDRADE Alan C. y BLOCH Carlos Jr., 2006. Novel dermaseptins from *Phyllomedusa hypochondrialis* (Amphibia). En: Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 347, 739–746 p.

BROCK, Thomas D., 1978. Capítulo 2, La célula procariótica, 15-60 p., En: Biología de los microorganismos, 2 edición, Ediciones Omega, S.A., Barcelona, 774 p.

BROOK, N. R., HARPER S. J., WALLER J. R., NICHOLSON M. L. , 2005. A consecutive series of 70 laparoscopic donor nephrectomies demonstrates the safety of this new operation. En: Transplantation Proceedings, vol. 37, No. 2, 627-628 p.

CASTRO, Herrera Fernando; BOLÍVAR García Wilmar y HERRERA Montes María Isabel, 2007. Guía de los Anfibios y Reptiles del Bosque de Yotoco, Valle del Cauca-Colombia, Grupo de Investigación Laboratorio de Herpetología, Universidad del Valle-Cali, Colombia, 70 p.

CONCEIÇÃO, Katia, KONNO Katsuhiko, RICHARDSON Michael, ANTONIAZZI Marta M, JARED Carlos, DAFFRE Sirlei, CAMARGO Antonio Carlos M. y PIMENTA Daniel C., 2006. Isolation and biochemical characterization of peptides presenting antimicrobial activity from the skin of *Phyllomedusa hypochondrialis*. En: Peptides, vol. 27, 3092–3099 p.

CONCEIÇÃO, Katia, KONNO Katsuhiko, MELO Robson Lopes de, ANTONIAZZI Marta M., JARED Carlos, SCIANI Juliana M., CONCEIÇÃO Isaltino M. , PREZOTO Benedito C., CAMARGO Antonio Carlos Martins de y PIMENTA Daniel C., 2007. Isolation and characterization of a novel bradykinin potentiating peptide (BPP) from the skin secretion of *Phyllomedusa hypochondrialis*. En: Peptides, vol. 28, 515-523 p.

CRAWSHAW G. J., 1992. The role of disease in amphibian decline. En: Declines in Canadian amphibian populations: designing a national monitoring strategy, Occasional paper no 76 (Bishop CA Pettit KE, eds). Ottawa, Ontario: Canadian Wildlife Service, 60-62 p.

CORPORACIÓN AUTÓNOMA REGIONAL DEL CAUCA (CRC), 2003, Dimensión Ambiental, 12 pp, En Municipio de Popayán-Plan de Ordenamiento Territorial-Documento Técnico, 351 p.

DALY, John W., BROWN G. B., DWUMAH Mensah M. y MYERS C. W., 1978. Classification of skin alkaloids from Neotropical Poison-Dart (Dendrobatidae), En: *Toxicon*, vol. 16, No. 2, 163-188 p.

DALY, John W., GARRAFFO H. Martin, SPANDE Thomas F., CLARK Valerie C., MA Jingyuan, ZIFFER Herman y COVER John F. Jr., 2003. Evidence for an enantioselective pumiliotoxin 7-hydroxylase in dendrobatid poison frogs of genus *Dendrobates*. En: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*, vol. 100, no. 19, 11092-11097 p.

DARST, Catherine R., GUERRERO Menéndez Pablo A., COLOMA Luis A. y CANNATELA David C., 2005. Evolution of Dietary Specialization and Chemical Defense in Poison Frogs (Dendrobatidae): A Comparative Analysis. En: *The American Naturalist*, vol. 165, no. 1, 56-69 p.

DUELLMAN, W. E., 1978. The biology of an Equatorial herpetofauna in Amazonian Ecuador, *Miscellaneous Publications of the Museum of Natural History University of Kansas* no. 65.

DUNSON, W. A., WYMAN R. L. y CORBETT E. S., 1992. A symposium on amphibian declines and habitat acidification. En: *Journal Herpetological*, 26, 342-349 p.

FAIVOVICH, Julián, HADDAD Célio F. B., GARCIA Paulo C. A., FROST Darrel A. y WHEELER Ward C., 2005. Systematic Review of The Frog Family Hylidae, With Special Reference To Hylinae: Phylogenetic Analysis And Taxonomic Revision. En: *Bulletin Of The American Museum of Natural History*, no. 294, 240 p.

FERNÁNDEZ, David I., GEHMANN John D. y SEPAROVIC Frances., 2009. Membrane interactions of antimicrobial peptides from Australian frogs. En: *Biochimica et Biophysica Acta*, Acta 1788, 1630–1638 p.

FORBES, Betty A., SAHM Daniel F. y WEISSFELD Alice S., 2004. Capítulo 27 Sección 7, 397-410 p., En: *Diagnostico Microbiológico*, 11ª ed, Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires.

FROST, Darrel R., 2007, Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 5.0, The American Museum of Natural History, <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.php>.

HANCOCK, Robert E. W. y CHAPPLE Daniel S., 1999. Minireview Peptide Antibiotics. En: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, vol. 43, no. 6, p.1317-1323.

KLUG, William S. y CUMMINGS Michael R., 1999. Concepts of genetic, 5^o edición, Prentice Hall, Madrid España, 814 p.

KOBAYASHI, Satoe, HIRAKURA Yutaka y MATSUZAKI Katsumi, 2001. Bacteria-selective synergism between the antimicrobial peptides α -helical magainin 2 and cyclic β -sheet tachyplesin I: toward cocktail therapy, En: Biochemistry, 40, 14330–14335 p.

KRUGLIAK, Miriam, FEDER Rina, ZOLOTAREV Vadim Y., GAIDUKOV Leonid, DAGAN Arie, GINSBURG Hagai y MOR Amram, 2000. Antimalarial Activities of Dermaseptin S4 Derivatives. En: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Vol. 44, No. 9, 2442-2451 p.

LAZARUS, L. H. y ATTILA, M., 1993. The Toad, Ugly and Venomous. Wears Yet A Precious Jewel in His Skin, En: Progress in Neurobiology, vol. 41, 473-507 p.

LOHNER, Karl. y PROSSNIGG Florian, 2009. Biological activity and structural aspects of PGLa interaction with membrane mimetic systems. En: Biochimica et Biophysica Acta, Acta 1788, 1656-1666 p.

MAMANI, Edgardo, LUJÁN Daniel y PAJUELO Giovanni, 2006. Perfil de sensibilidad y resistencia de *Staphylococcus aureus*. Experiencia en el Hospital Nacional Hipólito Unanue. En: Anales de la Facultad de Medicina Universidad Nacional Mayor de San Marcos, vol. 67, no. 2, 120-124 p.

MANGONI, María Luisa, MIELE Rossella, RENDA Tindaro G., BARRA Donatella y SIMMACO Maurizio, 2001. The synthesis of antimicrobial peptides in the skin of *Rana esculenta* is stimulated by microorganisms. En: *The FASEB Journal* express article, 10.1096/fj.00-0695fje. Published online April 6.

MARTÍNEZ, Pedro, ESPINAL Paula y MÁTTAR Salim, 2007. Epidemiología molecular de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a β -lactámicos de amplio

espectro en el Hospital San Jerónimo de Montería. En: Asociación Colombiana de Infectología, vol. 11, no. 1, 6-15 p.

MÉNEZ , André y STOCKLIN Reto, MEBS Dietrich, 2006. The venomous System genome proyect, En: Toxicon, ol. 47, 255-259 p.

NASCIMENTO, Anna Christina, FONTES Wagner, SEBBEN Antonio y CASTRO Mariana S., 2003. Antimicrobial Peptides From Anurans Skin Secretions. En: Protein and Peptide Letters, Rev., vol: 10, no. 3, 227- 238 p.

NASCIMENTO C., Anna Christina, ZANOTTA Lanuse C., KYAW Cynthia M., SCHWARTZ Elisabeth N. F., SCHWARTZ Carlos A., SEBBEN Antonio, SOUSA Marcelo V., FONTES Wagner y CASTRO Mariana S., 2004. Ocellatins: New Antimicrobial Peptides from the Skin Secretion of the South American Frog *Leptodactylus ocellatus* (Anura: Leptodactylidae). En: The Protein Journal, vol: 23, no. 8, 501-508 p.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS, 1997, Métodos de Dilución para el Estudio de Susceptibilidad Antimicrobiana para Bacterias de Crecimiento Aeróbico-Cuarta Edición; Norma Aprobada, M7-A4, Vol: 17, no.2, Wyne, Pensilvana, USA, 24p.

-----, 1998, Normativa para la Puesta en Práctica del Estudio de Susceptibilidad Antimicrobiana; Octavo Suplemento Informativo, M100-S8, Vol: 18, no.1, Wyne, Pensilvana, USA, 92p.

-----, 2000, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility, Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Fifth Edition, M7-A5, Vol: 20, no.2, Wine, Pensilvania, USA, 36p.

NÚÑEZ, Isabella, PEÑA Jessy Korina, QUINTANA María Eugenia, SUÁREZ Nicolás, VAZQUEZ Greissy, VELAZCO Rogelio y MARCANO Marcel Jesús, 2008. *Staphylococcus aureus* y alergias ¿Mito o realidad? En: VITAE Academia Biomédica Digital – Facultad de Medicina – Universidad Central de Venezuela, no. 34, 1-15 p.

OHNUMA, Aya J., CONLON J. Michael, YAMAGUCHI Keiko, KAWASAKI Hiroaki, COQUET Laurent, LEPRINCE Jérôme, JOUENNE Thierry, VAUDRY Hubert y IWAMURO Shawichi, 2007. Antimicrobial peptides from the skin of the Japanese mountain brown frog *Rana ornativentris*: Evidence for polymorphism among preprotemporin mRNAs. En: Peptides, vol. 28, 524-532 p.

PRATES, Maura V., SFORÇA Maurício L., REGIS William C. B., LEITE José R. S. A., SILVA Luciano P., PERTINHEZ Thelma A., ARAÚJO Antonio L. T., AZEVEDO Ricardo B., SPISNI Alberto y BLOCH Jr Carlos, 2004. Hilaseptin The NMR-derived Solution Structure of a New Cationic Antimicrobial Peptide from the Skin Secretion of the Anuran *Hyla punctata*. En: The Journal of Biological Chemistry, vol: 279, no.13, 13018–13026 p.

PRESCOTT, Lansing M., HARLEY John P. y KLEIN Donald A., 2002, Microbiology, 5 ed., Editorial The McGraw-Hill Companies, 1147 p.

PUKALA, Tara R., BOWIE John H., MASELLI Vita M., MUSGRAVE Ian F. y TYLER Michael J., 2006. Host-defence peptides from the glandular secretions of amphibians: structure and activity. En: The Royal Society of Chemistry, 23, 368–393 p.

RIERA, Sánchez Alicia, DAUD Adriana, GALLO Adriana, GENTA Susana, AYBAR Manuel y SÁNCHEZ Sara, 2003. Antibacterial activity of lactose-binding lectins from *Bufo arenarum* skin. En: Biocell, vol. 27, no.1, 37-46 p.

RINALDI, Andrea C., 2002. Antimicrobial peptides from amphibian skin: an expanding scenario, En: Curr. Opin. Chem. Biol, 6, 799-804 p.

RODRÍGUEZ, Angeles Guadalupe, 2002. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. En: Salud pública de México, x vol. 44, no.5, 464-475 p.

ROZEK, T., BOWIE J. H., WALLACE J. C. y TYLER M. J., 2000. The antibiotic and anticancer active aurein peptides from the Australian Bell Frogs *Litoria aurea* and *Litoria raniformis*. Part 2. Sequence determination using electrospray mass spectrometry. En: PubMed, vol. 14, issue 21, 2002-2011 p.

SIMMACO, Maurizio, KREIL Günther y BARRA Donatella, 2009, Bombinins, antimicrobial peptides from Bombina species. En: Biochimica et Biophysica Acta, Acta 1788, 1551–1555 p.

SOBERÓN CHÁVEZ, G., 2001. Pseudomonas aeruginosa. En: Microbios en línea, capítulo 3, Martínez Romero E. y Martínez Romero J. (eds). DGSCA, UNAM, [http:// www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/](http://www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/)

STUART, Simon N., CHANSON Janice S., COX Neil A. y YOUNG Bruce E., 2006. El estado global de los anfibios, 19-42 pp. En, ANGULO, Ariadne, ALMONACID Rueda José Vicente, MAHECHA Rodríguez José Vicentey LA

MARCA Enrique. Técnicas de Inventario y Monitoreo para los Anfibios de la Región Tropical Andina, Conservación Internacional, Serie Manuales de Campo N°.2, Bogotá D.C, Panamericana Formas e Impresos S.A., 298 p.

VANHOYE, Damien, BRUSTON Francine, NICOLAS Pierre y AMICHE Mohamed, 2003. Antimicrobial peptides from Hylid and Ranin frogs originated from a 150-million-year-old ancestral precursor with a conserved signal peptide but a hypermutable antimicrobial domain. En: Eur J. Biochem, 270, 2068-2081 p.

VOYLES, Jamie, YOUNG Sam, BERGER Lee, CAMPBELL Craig, VOYLES Wyatt F., DINUDOM Anuwat, COOK David, WEBB Rebecca, ALFORD Ross A., SKERRATT Lee F. y SPEARE Rick, 2007. Pathogenesis of Chytridiomycosis, a Cause of Catastrophic Amphibian Declines. En: Science, 2009, vol. 326, 582-585 p.

WOODHAMS, Douglas C., VREDENBURG Vance T., SIMON Mary-Alice, BILLHEIMERD Dean, SHAKHTOURD Bashar, SHYR Yu, BRIGGS Cheryl J., SMITH Louise A. Rollins y HARRIS Reid N., 2007. Symbiotic bacteria contribute to innate immune defenses of the threatened mountain yellow-legged frog, *Rana muscosa*. En: Biological Conservation, 138, 390-398 p.

WEINBERG, A., KRISANAPRAKORNKIT S. y DALE B. A., 1998. A propósito de: Péptidos antimicrobianos epiteliales: Revisión y significado para las aplicaciones orales. En: Crit. Rev. Oral Biol. Med., 9, 399-414 p.

YOUNT, Nannette Y., BAYER Arnold S., XIONG Yan Q. y YEAMAN Michael R., 2006. Advances in Antimicrobial Peptide Immunobiology. En: Wiley Periodicals, Inc., 45 p.

ZAIRI, Amira, BELAID Afifa, GAHBICHE Amina y HANI Khaled, 2005. Spermicidal activity of Dermaseptins. En: Contraception, 72, 447-453 p.

ZHAO, Hongxia, 2003. Mode of Action of Antimicrobial Peptides, Academic Dissertation, (PDF), Helsinki, 99 p., <<http://ethesis.helsinki.fi>, ISBN 952-10-1205-6.

ZASLOFF, Michael, 1987. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: Isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. En: Proc. Natl. Acad. Sci., vol: 84, 5449-5453 p.

ZASLOFF, Michael, 2009. Mysteries that still remain-Preface. En: Biochimica et Biophysica Acta, Acta 1788, 1693–1694 p.

ANEXOS

Anexo 1 Estadísticos descriptivos para las variables del experimento.

Estadísticos descriptivos

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
concentracion	486	1,00000	9,00000	5,0000000	2,584649
lectura	486	,039	1,267	,56337	,206621
bacteria	486	1,00	3,00	2,0000	,81734
habitat	486	1,00	2,00	1,5000	,50052
bloques	486	1,00	3,00	2,0000	,81734
CONBAC	486	11,00	93,00	52,0000	25,85941
N válido (según lista)	486				

Anexo 2 Prueba Kruskal Wallis para verificar la diferencia entre la interacción de las variables concentración y bacterias (CONBAC), respecto a la lectura. Resultado: No significativo.

Estadísticos de contraste^{a,b}

	lectura
Chi-cuadrado	37,916
gl	26
Sig. asintót.	,070

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: CONBAC

Anexo 3 Prueba U de Mann-Whitney para la comparación de la cepas a partir de la secreción cutánea de las ranas colectadas en pastizal.

U de Mann-Whitney	
Secreción cutánea de la población del pastizal	
Cepas	Sig. Asintót.
<i>E. coli</i> vs. <i>P. aeruginosa</i>	,000
<i>E. coli</i> vs. <i>S. aureus</i>	,000
<i>P. aeruginosa</i> vs. <i>S. aureus</i>	,000

Anexo 4 Prueba U de Mann-Whitney para la comparación de la cepas a partir de la secreción cutánea de las ranas colectadas en rastrojo.

U de Mann-Whitney	
Secreción cutánea de la población del rastrojo	
Cepas	Sig. Asintót.
<i>E. coli</i> vs. <i>P. aeruginosa</i>	,003
<i>E. coli</i> vs. <i>S. aureus</i>	,000
<i>P. aeruginosa</i> vs. <i>S. aureus</i>	,000