

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia



“Determinación de la presencia de bacterias del género *Vibrio* en la piel de la rana gigante del Titicaca (*Telmatobius culeus*) de vida libre”

Tesis para optar el Título Profesional de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Gabriela Alexandra Tuesta Reyna

Bachiller en Medicina Veterinaria y Zootecnia

LIMA - PERÚ

2021

A todo aquel comprometido con la
conservación de la Rana gigante del Titicaca

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento a mi Alma Matter por la formación recibida en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y por el apoyo para el uso del laboratorio de Microbiología y Nutrición. Así mismo, el acompañamiento recibido de muchas personas me permitió culminar esta investigación, a quienes quiero reconocer nombrándolos:

En primer lugar, al director de mi tesis, Mg. Roberto Elías Piperis, por confiarme ser parte del proyecto “Estado de conservación de la rana gigante *T. culeus* y otros anfibios acuáticos *Telmatobius spp.* en el lago Titicaca (sector peruano) y otras lagunas altoandinas del departamento de Puno”, del cual fue parte. Por su paciencia, su guía y la posibilidad de encontrar un tema de tesis con una especie que me apasiona.

A la Mg. Micaela de La Puente León y al Mg. David Montes Iturrizaga, por sus aportes y visión crítica para realizar un correcto trabajo.

Mi infinito agradecimiento al zoológico de Denver por haber decidido enfocarse en la conservación de la rana gigante del Titicaca, y así llegar al financiamiento de esta investigación.

Al Blgo. Enrique Ramos por su valiosa ayuda en la colección de ejemplares. A Jazhel y Gariz de Natural Way por su amable dedicación para realizar los análisis de calidad de agua, y a la Lic. Maria Luz Zamudio Rojas y el Lic. Willi Quino Sifuentes del Instituto Nacional de Salud por apoyarme desinteresadamente.

A los dirigentes y a toda la comunidad de Perka Norte y Chifrón, por permitirnos el acceso y acompañarnos en el proceso de muestreo.

También, al Dr. Carlos Shiva y a la Mg. Rosa Fernández, siempre dispuestos a absolver mis consultas, incluso fuera de horas.

A Elvis, al personal de seguridad y al personal administrativo por su confianza, la cual me proporcionó muchas facilidades.

Un especial agradecimiento a Rubens, Ayrton, Anthony, Jennifer, Camila, William, Sheyla, Almendra y Katya, por ser mi sostén emocional, por escucharme y estar conmigo tanto en los buenos momentos como en los no tan buenos.

A Layka, que me ha acompañado desde que inicié este camino en la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

A Wang Yibo y Xiao Zhan por motivarme e inspirarme con sus carreras profesionales y sus lecciones de pasión y esfuerzo.

Finalmente, debo agradecer a las personas que hicieron todo esto posible: mis padres. Aunque las palabras nunca serán suficientes para describir mi eterna gratitud con ellos, su esfuerzo y cariño incondicional me llevaron a este punto donde finalmente puedo decir: lo logré.

ABSTRACT

One of the factors of the rapid disappearance of the Titicaca Water Frog (*Telmatobius culeus*) is the illegal collection for their consumption in juices. This activity is popular in Lima since people attributed it healing and aphrodisiac properties. But it is possible that pathogenic microorganisms for humans are present in the skin of these frogs, such as *Vibrio cholerae*, *V. alginolyticus* and *V. fluvialis*, known to cause intestinal infections, mostly. Due to environmental conditions and the contamination of Lake Titicaca, it was proposed that these bacteria of the genus *Vibrio* could be present in the skin of wildlife *T. culeus*. The study was carried out in March 2018, samples were collected by swabbing the cutaneous surface of 35 frogs captured at two points of Lake Titicaca (North Perka and Chifrón). The samples were sent to the microbiology laboratory of the Universidad Peruana Cayetano Heredia where they were grouped, enriched and cultivated in the TCBS and TSA agar medium. Subsequently, biochemical tests were carried out and lastly, the samples were sent to the National Health Institute (INS), where an API 20 E kit was used for identification. No bacteria of the genus *Vibrio* were identified. The results indicated the presence of *Aeromonas hydrophila*, *Shewanella putrefaciens* and *Shewanella* spp.

Keywords: *Telmatobius culeus*, *Vibrio*, epidemiology, microbiology

RESUMEN

Uno de los factores de la rápida disminución de la población de la rana gigante del Titicaca (*Telmatobius culeus*) es la colecta ilegal para su consumo en jugos. Esta actividad es popular en Lima puesto que se le atribuyen propiedades curativas y afrodisiacas, pero es posible que microorganismos patógenos para el humano estén presentes en la piel de estas ranas, tales como *Vibrio cholerae*, *V. alginolyticus* y *V. fluvialis*, conocidos por ocasionar mayormente cuadros de infección a nivel intestinal. Debido a las condiciones ambientales y contaminación del lago Titicaca, se planteó la hipótesis de que estas bacterias del género *Vibrio* podrían estar presentes en la piel de *T. culeus* de vida libre. El estudio se llevó a cabo en marzo del 2018, se realizaron hisopados de la superficie cutánea de 35 ranas capturadas en dos puntos del lago (Perka Norte y Chifrón). Las muestras se enviaron al laboratorio de microbiología de la Universidad Peruana Cayetano Heredia donde se agruparon, enriquecieron y cultivaron en los medios Agar TCBS y TSA. Posteriormente se usaron pruebas bioquímicas y se enviaron al Instituto Nacional de Salud, donde se utilizó el kit API 20 E para su identificación. No se identificaron bacterias del género *Vibrio*. Los resultados indicaron la presencia de *Aeromonas hydrophila*, *Shewanella putrefaciens* y *Shewanella* spp.

Palabras clave: *Telmatobius culeus*, *Vibrio*, epidemiología, microbiología

INTRODUCCIÓN

El lago Titicaca se encuentra en la región altiplánica de Perú (Departamento Puno) y Bolivia (Departamento La Paz), a 3,810 msnm y tiene un área de 8,100 km² aproximadamente. Abarca dos sectores, separados por el estrecho de Tiquina: El lago mayor hacia el noroeste, con 6,450 km² de área. Y el lago menor, llamado también lago Huiñaymarca, hacia el sureste, con 1,400 km². Tanto Perú como Bolivia comparten los dos sectores, aunque la mayor parte corresponde al Perú (55%). Este lago es de gran importancia para la conservación ya que en esta región se encuentra la mayor concentración de diversidad de ecosistemas, especies y recursos genéticos del altiplano. Es debido a ello que fue designado como humedal de importancia internacional o sitio Ramsar en el año 1997 (MINAM, 2014).

Dentro de las especies que pueden ser halladas, está la rana gigante del Titicaca (*Telmatobius culeus*). Esta especie fue descrita por primera vez por Garman en 1876, es miembro la familia Telmatobiidae del Orden Anura, es endémica del lago Titicaca y lagunas adyacentes de la región (Ramos *et al*, 2019). *T. culeus* es una rana estrictamente acuática conocida por su gran tamaño, se han observado ejemplares que miden 140 mm de SVL (snout-vent length) y pesan más de 250 g (Hutchison *et al*, 1976). Su cabeza es ancha y aplanada, al igual que su cuerpo; su piel es lisa, holgada, con prominentes pliegues, puede ser verrugosa a los costados y presenta múltiples glándulas a nivel dorsal que secretan una mucosa no irritante pero pegajosa (Allen, 1922; Vellard, 1951).

Los bajos niveles de oxígeno del agua, llevaron a estas ranas a desarrollar diversas adaptaciones. Una de ellas es su abundante piel distribuida en pliegues, que le permite extender la superficie donde se lleva a cabo el intercambio gaseoso (Vellard, 1922; Hutchison *et al*, 1976). Cuenta con pulmones y en algunas disecciones se ha encontrado pequeñas cantidades de gas dentro; sin embargo, son muy reducidos, poco vascularizados y miden menos de la tercera parte que se esperaría de una rana de su tamaño, es por eso que se considera que la respiración es básicamente cutánea (Allen, 1922; Hutchison *et al*, 1976).

Otra de las adaptaciones para la vida acuática a gran altitud es poseer una elevada cantidad de glóbulos rojos, los cuales son muy pequeños a comparación de otros anuros y tienen importante afinidad por el O₂, esto favorece la oxigenación de los tejidos del cuerpo y la eliminación del dióxido de carbono eficientemente (Hutchison *et al*, 1976). Las extremidades posteriores son más largas que las anteriores y pueden llegar a ser más largas que el cuerpo (SVL), completando su disposición al nado. Los cuatro dedos de los miembros anteriores son cortos y libres, y los cinco dedos de los miembros posteriores, largos y palmeados (ALT y PNUD, 2000).

Su alimentación natural comprende pequeños peces del género *Orestias*, invertebrados acuáticos, gusanos, caracoles, anfípodos y renacuajos (Allen, 1922; ALT y PNUD, 2000). No se han reportado depredadores propios de la especie, pero se ha observado gaviotas y zambullidores alimentándose de ellas (Jhazel Quispe, comunicación personal).

En las últimas décadas, un alto porcentaje de la población autóctona se ha visto reducido (Ramos *et al*, 2019; ALT y PNUD, 2002). Al ser un anfibio estrictamente acuático, esta especie es sensible en gran medida a cambios en el ambiente que lo rodea y es un excelente indicador de la calidad ambiental. Una de las principales amenazas de esta especie es la degradación de hábitat debido principalmente a la contaminación por vertimiento de aguas residuales sin tratamiento adecuado, disposición de residuos sólidos, vertimientos de la actividad minera, pesticidas, agricultura y ganadería (MINAM, 2014; Mendoza, 2018).

Otra amenaza preocupante es la colecta por parte de pescadores artesanales. Los ejemplares extraídos son vendidos a mayoristas y son transportados en cajas de madera desde Puno hacia diferentes partes del Perú, para finalmente ser destinados al consumo humano (Puntriano *et al*, 2018). Uno de los destinos más importantes es la ciudad de Lima, donde existe una gran demanda para el consumo de rana licuada conocido como “extracto de rana” y se sacrifican un promedio de 150 ranas diarias (ALT y

PNUD, 2000). Esto debido a que se le atribuye propiedades medicinales y afrodisiacas (ALT y PNUD, 2000; Reading 2011), pese a que no existe evidencia científica que lo confirme.

También se enfrentan a otras amenazas como la presencia de especies exóticas invasoras y enfermedades como la quitridiomycosis. Esta es una enfermedad infecciosa causada por el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) y fue detectado en *T. culeus* en la zona de amortiguamiento de la Reserva Nacional del Titicaca en el 2014 (Berenguel, 2014).

La rana gigante del Titicaca se encuentra categorizada como “En Peligro” por la Lista Roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza - UICN (IUCN SSC Amphibian Specialist Group, 2020) y “En Peligro Crítico” por el Estado Peruano (MINAGRI, 2014), además, se encuentra en el Apéndice I de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres - CITES (UICN y TRAFFIC, 2016). Al ser una especie endémica del lago Titicaca, es considerada patrimonio natural, asimismo declarada especie de importancia por el Gobierno Regional de Puno (GRP, 2014); cumple un rol importante en la cadena alimentaria y su desaparición puede llevar a la eutrofización del agua, cambios en la abundancia de invertebrados, fitoplancton y la dinámica de materia orgánica, por lo que su colecta ilegal conlleva a la alteración del ecosistema (Reading *et al*, 2011; Mendoza, 2018).

Entre los años 2012 y 2013, alrededor de 400 individuos de ranas gigantes del Titicaca fueron decomisados en el ex mercado La Parada del distrito La Victoria, Lima-Perú, destinadas a ser ingredientes para jugos de rana (Aaronson, 2014). Se realizaron estudios para determinar la microbiota de la piel de estas ranas, y los resultados revelaron la presencia de bacterias *Vibrio cholerae*, *V. alginolyticus* y *V. fluvialis*, entre otras especies (Edery, 2015). Se plantearon tres escenarios donde las bacterias pudieron haber sido adquiridas: el lugar de origen (lago Titicaca), durante el trayecto de Puno a Lima y el lugar de decomiso. Rastrear los pasos de los comerciantes de estas ranas es complicado por lo que primero se debe descartar la posibilidad de que hayan sido adquiridas en el lago. Es por ello que se formuló la hipótesis de que diferentes vibrios están presentes en la piel de *T. culeus* de vida libre.

Los tres microorganismos aislados en el estudio de Ederly (2015), han sido reportados en heces de pacientes con infección gastrointestinal y también, con menos frecuencia, en infecciones de tejidos blandos o heridas (Blake, 1980; Uh *et al*, 2001; Huang *et al*, 2005; Vinh y Embil, 2005; Ramamurthy *et al*, 2014). Sin embargo, no se cuenta con reportes de estas bacterias en la zona hasta la actualidad, a excepción del reporte de *V. cholerae* O1 biotipo El Tor; un agente patógeno en humanos que fue aislado en muestras de agua del lago Titicaca en 1991 (Borroto, 2005).

Uno de los factores que podrían predisponer a la presencia de bacterias del género *Vibrio* en el lago es la contaminación por aguas residuales no tratadas. En un estudio se determinó que más del 50% de la población que habita en las riberas del lago carece de alcantarillado y las pocas plantas de tratamiento de aguas servidas que existen están colapsadas (MINAM, 2014). Otro factor importante es la salinidad del lago. Los vibrios habitan en agua de mar y estuarios debido a su concentración de sal, 3.5% en promedio y de 0.05 a 3.5%, respectivamente (NOAA, 2007), pero pueden ser encontrados en fuentes de agua dulce (Bennett *et al*, 2014). Se han descrito zonas del lago por la parte peruana con valores de salinidad que están en el rango de 0.06 y 0.08% (MINAM, 2014), esto apoyaría la hipótesis de que bacterias del género *Vibrio* podrían habitar en el lago, puesto que esas lecturas ya se consideran para agua salobre oligohalina (Fuentes y Massol-Deyá, 2002).

El objetivo de este trabajo de investigación fue determinar la presencia de bacterias del género *Vibrio* en la piel de las ranas gigantes del lago Titicaca de vida libre, su relación con la contaminación del lago y la presencia de estas bacterias debido a su relevancia para la salud pública como para la conservación de *T. culeus* y otras especies en el lago.

METODOLOGÍA

1. Lugares del estudio

Los lugares donde se tomaron las muestras fueron la comunidad de Perka Norte, distrito de Platería, en la provincia y departamento de Puno en las coordenadas UTM 19L 417890E 8249345N, y la comunidad de Chifrón, distrito de Capachica, en la provincia y departamento de Puno en las coordenadas UTM 19L 412741E 8271452N (Figura 1). Ambos lugares cumplieron con las siguientes condiciones: se encuentran en el lado peruano del lago Titicaca, presentan una salinidad de 0.08% en promedio (MINAM, 2014) con ranas previamente avistadas (Dejoux e Iltis, 1991) y con presencia de poblados circunlacustres y desembocadura de desagües (UNEP y OEA, 1996). Perka Norte es el lugar con mayor número de individuos avistados y Chifrón, el segundo, según el último estudio de abundancia relativa (Ramos *et al*, 2019). Las principales actividades socioeconómicas de Perka Norte son la pesca, agricultura, ganadería y turismo vivencial. De similar manera, en Chifrón se realiza turismo en la zona de playa y zona de camping.

2. Tipo de estudio

Este fue un estudio exploratorio de corte transversal que fue parte del proyecto “Estado de conservación de la rana gigante *T. culeus* y otros anfibios acuáticos *Telmatobius* spp. en el lago Titicaca (sector peruano) y otras lagunas altoandinas del departamento de Puno”, con la Autorización de Investigación N.º AUT-IFS-2016-045.

3. Colección de muestras

Las capturas se realizaron en marzo del 2018 y el tipo de muestreo fue por conveniencia, es decir, se recolectaron todos los anfibios metamorfoseados (ranas adultas o juveniles) que se encontraron. Para esto se ingresó al lago con traje para buceo, máscara y esnórquel, y se capturó los ejemplares con ayuda de una red de mano para pesca, con un tamaño de malla de 15 mm (Watson *et al*, 2017),

previamente desinfectada con Virkon®. Al momento de capturarlas, estas se colocaron dentro de bolsas con cierre hermético Ziploc® con un tercio de agua del mismo lugar de donde se extrajeron para mantenerlas húmedas y puedan respirar (Aguirre y Lampo, 2006). Los animales estuvieron fuera del lago por un periodo máximo de 45 minutos, siempre sumergidas en agua proveniente del mismo lago, a excepción del momento de la toma de muestra, que duró 2 minutos aproximadamente. Se utilizaron guantes de nitrilo para la manipulación de los anfibios, instrumentos y muestras. Una persona se encargó de la sujeción correcta de los ejemplares colectados, y otra del manejo de instrumental y toma de muestras.

Se les tomaron las medidas de longitud corporal (SVL) con un vernier digital, peso corporal con una balanza de mano Pesola® (300g) y se inspeccionó todo el cuerpo en busca de parásitos externos y lesiones. Luego se procedió a realizar el hisopado alrededor de todo el cuerpo. Los hisopos con las muestras se guardaron en el medio de transporte Amies con carbón contenido en tubos (Cevallos *et al*, 2002). Estos se conservaron a temperatura ambiente durante 48 a 72 horas en una caja de tecnopor hasta llegar al laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

4. Procesamiento de muestras

Ya que el estudio trataba de determinar la presencia de bacterias del género *Vibrio* y no asociarlas a un valor de frecuencia, se formaron grupos. En Perka Norte se colectaron 17 muestras de ranas por lo que se formaron dos grupos de seis hisopos y uno de cinco hisopos. En Chifrón se colectaron 18 muestras de ranas y se formaron tres grupos de seis hisopos.

Se tomaron los hisopos con material biológico agrupados y se mezclaron en un frasco con agua peptonada alcalina (APW). Los frascos de APW se incubaron a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 6 a 8 h (Pazzaglia *et al*, 1993; Lesmana *et al*, 1997; Kaysner *et al*, 2004). Con ayuda de un asa de siembra, se transfirió 3 mm de la película superficial del cultivo de los frascos de APW a la superficie de una placa de agar

Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa (TCBS) seca y se sembró trazando estrías. Posteriormente, las placas se incubaron de 18 a 24 h a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (Kaysner *et al*, 2004). Se anotaron las características morfológicas de las colonias.

Para realizar las pruebas bioquímicas se resembraron las colonias en agar de soja tríptica con cloruro de sodio en concentración del 2% (TSA-2% NaCl) (Kaysner *et al*, 2004). Se realizó la tinción Gram para verificar que los microorganismos eran bacilos Gram negativos. Después de comprobarlo, las colonias se congelaron para mantenerlas viables debido al tiempo y disponibilidad insuficiente del laboratorio. Este proceso se realizó en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL. Se colocó 0.8 mL de Brain Heart Infusion Agar (BHI), con ayuda de un asa de siembra, se colocó una colonia dentro del tubo y cuando la colonia creció, se agregó 0.2 mL de glicerol. Se homogenizó cada tubo con un vórtex, se colocaron en una caja de almacenamiento y se llevaron a la congeladora a -80°C .

Las muestras se reactivaron posteriormente usando APW y sembrando en TSA-2% NaCl. Cuando las colonias crecieron, se llevaron a cabo las pruebas de oxidasa y catalasa. Se excluyeron aquellas bacterias que dieron negativo a alguna de las dos pruebas ya que las bacterias del género *Vibrio* son positivas a ambas. Luego, se realizó otra resiembra en TSA-2% NaCl para tener colonias frescas y poder realizar la prueba de sensibilidad al agente vibriostático O/129 (Bioanalyse, Turquía), para discos de 10 µg y 150 µg. La prueba de agente vibriostático (O/129) se llevó a cabo en agar de soja tríptica con cloruro de sodio en concentración del 0.5% (Dalynn Biologicals, 2014). Se anotaron los resultados para cada disco y se excluyeron aquellos que dieron negativo a ambos discos. Además, se realizaron pruebas de salinidad para cada una de las bacterias seleccionadas al 4%, 6% y 8% de NaCl en tubos de microcentrífuga de 1.80 mL con APW. Esto debido a que los vibrios patógenos (excepto *V. cholerae* y *V. mimicus*) pueden tolerar altas concentraciones de sal a diferencia de las aeromonas que soportan una concentración máxima de 4% de NaCl generalmente (McClure *et al*, 1994; García, 1997; Fu *et al*, 2014). Los resultados de las pruebas de salinidad se consideraron positivos en caso de presentar turbidez por crecimiento de las bacterias y negativos en caso de ausencia de turbidez.

Después de seleccionar las cepas positivas, se remitieron muestras al Laboratorio de Enteropatógenos del Instituto Nacional de Salud para la identificación de cepas. De las 11 colonias testeadas en la prueba de concentración de NaCl, una no creció en la resiembra. Por lo que se enviaron solo 10 cepas. Se utilizó la tira de diagnóstico API® 20E y el programa API WEB para la identificación de las colonias aisladas.

Se decidió considerar la presencia de bacterias del género *Vibrio* en piel de *T. culeus* como cierta si alguna fuera aislada e identificada. Si existiese presencia de vibrios, los resultados se expresarían según lugar de toma de muestras. De lo contrario, no se podría asegurar la ausencia de las bacterias en la piel de las ranas gigantes del Titicaca o la zona.

Este trabajo fue aprobado por el Comité de ética institucional de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Los animales fueron tratados de forma responsable y bajo los principios éticos que la universidad rige. Cabe resaltar que luego de la captura y toma de muestras, los animales fueron devueltos al lago en el mismo lugar donde fueron colectados.

RESULTADOS

Se capturaron 17 ranas en Perka Norte y 18 ranas en Chifrón. Las ranas en Perka Norte tuvieron un peso corporal promedio de 24.15 g con una longitud corporal (SVL) de 57.35 mm. En cuanto a las ranas colectadas en Chifrón, el peso estuvo alrededor de los 34.06 g y SVL promedio fue de 58.12 mm. Se encontraron sanguijuelas adheridas sobre la piel de algunos animales, observándose una menor presencia de estos en las ranas de Perka Norte a comparación de Chifrón. (Tabla 1 y 2).

Tabla 1. Medidas de longitud (SVL), peso y número de sanguijuelas de las ranas colectadas en Perka Norte

Nº de rana	Longitud - SVL (mm)	Peso (g)	Sanguijuelas (n)
1	66.1	29.9	0
2	54.5	27	6
3	50.3	15.5	4
4	51.1	26.5	8
5	54.8	22	3
6	56.7	19	1
7	52.5	18	0
8	59.2	26.7	7
9	64.5	29	2
10	60.3	28	0
11	58.7	27.5	0
12	62.2	24.5	1
13	56.9	22	0
14	51.3	19.5	0
15	59.7	25	0
16	54.8	22.5	0
17	61.4	28	0
Promedio	57.35	24.15	

Tabla 2. Medidas de longitud (SVL), peso y número de sanguijuelas de las ranas colectadas en Chifrón

Nº de rana	Longitud - SVL (mm)	Peso (g)	Sanguijuelas(n)
1	54.3	33	2
2	60.4	36	2
3	55.5	26	4
4	62	33	5
5	57.8	39	0
6	62.9	35	4
7	55	35	0
8	58.5	39.5	0
9	52	28	4
10	61.7	35	5
11	61.5	42.5	3
12	62.1	39.5	4
13	58.2	31	0
14	53.4	32	3
15	60.9	39	6
16	56.4	30	5
17	56.5	29.5	3
18	57.1	30	7
Promedio	58.12	34.06	

En cuanto al procesamiento de muestras de la piel de las ranas, se seleccionaron 27 colonias que crecieron en agar TCBS. Después de analizarlas según sus resultados frente a la tinción Gram y reacciones de catalasa, oxidasa y sensibilidad a O/129, se escogieron 11 colonias (siete de Perka Norte y cuatro de Chifrón). Estas colonias fueron escogidas debido a que eran compatibles con características fenotípicas de bacterias del género *Vibrio*.

Se enviaron diez cepas sospechosas de pertenecer al género *Vibrio* al INS. De estas, cuatro cepas resultaron negativas a las tres concentraciones de NaCl (4%, 6% y 8%) utilizadas en la prueba de salinidad. Las seis cepas restantes (GT-2, GT-3, GT-7, GT-9, GT-13 y GT-18) arrojaron un resultado positivo al crecer al 4% de NaCl; y solo una cepa creció al 6% de NaCl (GT-18).

Se identificaron nueve cepas del género *Shewanella*, dos de ellas *Shewanella putrefaciens* y una cepa de *Aeromonas hydrophila*. Los resultados de la prueba NaCl a diferentes concentraciones y los resultados obtenidos por el INS se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3.- Resultados de la prueba de NaCl a diferentes concentraciones e identificación por el INS

Cepa	Concentración NaCl			INS
	4%	6%	8%	
GT-1	-	-	-	<i>Shewanella</i> spp.
GT-2	+	-	-	<i>Shewanella</i> spp.
GT-3	+	-	-	<i>Shewanella</i> spp.
GT-7	+	-	-	<i>Shewanella</i> spp.
GT-8	-	-	-	<i>Aeromonas hydrophila</i>
GT-9	+	-	-	<i>Shewanella</i> spp.
GT-13	+	-	-	<i>Shewanella putrefaciens</i>
GT-14	-	-	-	<i>Shewanella</i> spp.
GT-17	-	-	-	<i>Shewanella</i> spp.
GT-18	+	+	-	<i>Shewanella putrefaciens</i>

+: Resultado positivo, -: Resultado negativo

DISCUSIÓN

En el presente estudio no se pudo aislar bacterias del género *Vibrio* de la piel de las ranas del Titicaca muestreadas, que era el objetivo de esta investigación. Esto pudo estar relacionado al limitado número de muestras tomado o a que este género de bacteria no se encuentra en la piel de las ranas *Telmatobius* de vida libre en el lago Titicaca. Es posible, también, que no se encuentre en los individuos de los dos lugares muestreados, aunque sí se pudo obtener otras especies de bacterias como se aprecia en los resultados.

A pesar de que se empleó una técnica de enriquecimiento y un medio de cultivo selectivo para favorecer la proliferación y crecimiento de las bacterias del género *Vibrio*, otras especies, como *Aeromonas hydrophila*, *Plesiomonas shigelloides*, *pseudomonas*, *Escherichia coli* y *Enterococcus faecalis*, pueden crecer, como se observó en este estudio. Si bien se usó la prueba de oxidasa y la de discos de agente vibriostático (O/129), que son utilizadas para diferenciar bacterias de este género, algunas cepas de *A. hydrophila* pueden ser sensibles a este y dar resultados positivos (Takahashi *et al*, 1985). Esto concuerda con la identificación posterior de una de las cepas sensibles a O/129 y negativa a las tres concentraciones de la prueba de salinidad. *A. hydrophila* es autóctona de estanques de agua dulce y lagos, y ha sido reportada en poblaciones naturales de anuros y salamandras acuáticas. Algunas veces se asocia con mortalidad masiva. Sin embargo, la incidencia de esta y la enfermedad asociada sigue estando poco documentada (Rafidah *et al*, 1990).

Las nueve cepas restantes fueron identificadas como pertenecientes al género *Shewanella*. Este grupo de bacterias pertenece a la familia *Alteromonadaceae*. Están emparentadas con la familia *Vibrionaceae* y algunas de sus especies estuvieron clasificadas dentro esta familia hace algunos años. Tienden a encontrarse en ambientes marinos y ser relacionadas con la biorremediación de ambientes contaminados con elementos tóxicos, por ejemplo, metales pesados. Pero puede aislarse de una amplia gama de hábitats, desde medios acuáticos y sedimento hasta alimentos refrigerados como lácteos, carne

de aves, carne de res y mariscos. También se pueden encontrar en ambientes donde el agua y el suelo están mezclados con petróleo crudo u otros productos derivados del petróleo (Garrity, 2005; Nealson y Scott, 2006; Janda y Abbott, 2012).

En el caso de *Shewanella putrefaciens*, no se ha podido definir lugares de aislamiento específicos debido a la heterogeneidad de la especie, pero los más comunes son los productos alimenticios ligeramente salados, el medio marino costero, los sedimentos de agua dulce y agua cercana al sedimento (Garrity, 2005).

Según I-Son Ng y colaboradores (2015), las shewanellas tienen la capacidad de utilizar varios aceptores de electrones terminales, lo que les permite sobrevivir en entornos extremos y hostiles, como la ausencia de oxígeno o temperaturas muy bajas. Además, son capaces de reducir el hierro sólido y óxidos de manganeso, tal es el caso de *S. putrefaciens* y *S. oneidensis* (Beliaey y Saffarini, 1998; Thamdrup, 2000; Nealson y Scott, 2006). Se menciona que *S. oneidensis* puede reducir tanto los metales anteriormente mencionados como el cobre y el zinc y este efecto es potenciado al estar en contacto con un compuesto que incluya glucosa (Ghorbanzadeh *et al*, 2018).

El hallazgo de shewanellas en la piel de las ranas del lago Titicaca se puede deber a que estas bacterias no tienen inconvenientes con la baja salinidad, poca disponibilidad de oxígeno o baja temperatura del cuerpo de agua. Por otro lado, podrían funcionar como biorremediadores debido a la contaminación del lago por vertimiento de aguas residuales sin tratamiento adecuado, residuos sólidos y residuos de la actividad minera. Dado que esta última se realiza, en su mayoría, de manera ilegal, se generan residuos tóxicos por los insumos utilizados o por las sustancias químicas liberadas del proceso. Algunas de ellas son: cobre (Cu), zinc (Zn), plomo (Pb), cadmio (Cd), arsénico (As) y mercurio (Hg).

Se han descrito casos de infecciones por bacterias del género *Shewanella* en humanos, en su mayoría de Asia y Europa. En muchos de los reportes, se atribuyeron esas infecciones a *S. putrefaciens* o solo al género, pero con el paso del tiempo y el avance de los estudios filogenéticos, una gran parte

pudo reclasificarse como *Shewanella algae*, la cual tiene la capacidad de producir tetrodotoxina, una neurotoxina potente. Se cree que varias de las infecciones reportadas con agente causal *S. putrefaciens* corresponden a infecciones por *S. algae* (Simidu *et al*, 1990; Vignier *et al*, 2013; Janda y Abbott, 2014).

A diferencia de otras bacterias acuáticas como *Vibrio* y *Aeromonas*, conocidas por causar enfermedades tanto en humanos como en animales, no se conoce con exactitud la patogenicidad de *Shewanella* (Janda y Abbott, 2014); sin embargo, la extensión de las lesiones es similar a las ocasionadas por *Vibrio* y *Aeromonas* (Nath *et al*, 2011; Vignier *et al*, 2013). Se han reportado presencia de shewanellas en abulones en estado post larval (*Haliotis diversicolor supertexta*) enfermos y mejillones cebra (*Dreissena polymorpha*) estresados, y se ha identificado a *S. algae* en lesiones ulcerativas en un pez marino (*Scinenops ocellata*) (Cai *et al*, 2006).

Se ha podido aislar *S. putrefaciens* tanto de peces marinos (*Siganus rivulatus*) como de agua dulce (*Oreochromis niloticus*, *Oncorhynchus mykiss* y *Cyprinus carpio* L) y se ha observado mortalidad entre el 30 y 80% de la población en estudios de infección experimental vía inyección intraperitoneal. Las mortalidades más bajas se registraron en peces de agua dulce y las más altas, en peces marinos. Cabe resaltar que, durante el intento de infección mediante inmersión en un medio con alta concentración de estas bacterias en el agua, no hubo sintomatología ni mortalidad. Por lo que los autores sugieren que pueden existir diferentes fenotipos entre aquellas cepas que habitan fuentes de agua dulce y las que habitan aguas marinas, y ser patogénicas en condiciones de gran estrés (Saeed *et al*, 1987; Kozińska y Pekala, 2004; El-Barbary, 2017).

Existe un gran vacío en cuanto a la distribución y ecología de las bacterias del género *Shewanella*, pero dado su parecido con los vibrios y otras bacterias acuáticas, es probable que sean tanto patógenas como saprófitas dependiendo de las condiciones medio ambientales y la condición de los huéspedes. En cuanto a los mecanismos de transmisión, se presume que sucede por abrasiones mucocutáneas o traumatismos por penetración (Liu *et al*, 2012), lo cual coincide con los estudios de infección experimental en peces mencionados anteriormente.

En esta investigación no fue posible aislar bacterias del género *Vibrio* de la piel de *T. culeus*; sin embargo, no se puede afirmar que estas no se encuentren presentes en el lago Titicaca. No hay estudios previos que apoyen o rechacen la presencia de estas bacterias en el lago Titicaca a excepción del único reporte en 1991. En ese año, durante la epidemia del cólera en Perú, se llegó a aislar *V. cholerae* O1 biotipo El Tor en agua del lago. Fueron pocos los casos de enfermedad por *V. cholerae* en la ciudad de Puno a comparación de los reportados en todo el Perú, incluso los aislamientos se catalogaron como infrecuentes. Todo ello fue asociado a la altura de la ciudad y el lago Titicaca, además de las bajas temperaturas registradas durante la toma de datos (Tamplin y Parodi, 1991).

Este estudio fue parte del proyecto de investigación “Estado de conservación de la rana gigante *T. culeus* y otros anfibios acuáticos *Telmatobius* spp. en el lago Titicaca (sector peruano) y otras lagunas altoandinas del departamento de Puno”, que además abarcó el análisis de parámetros físicos y químicos del agua del lago Titicaca. Se registraron temperaturas promedio de 13° C para Chifrón y 16° C para Perka Norte. Los vibrios tienen preferencia por aguas con temperaturas cálidas o dentro de los 14° C y 37° C (Rajkowski, 2009; Gavilán y Martínez-Urtaza, 2011; Batabyal, 2015). En este caso, la temperatura del agua de Perka Norte se considera adecuada, mientras que la encontrada en Capachica, no excede el rango por mucho. También se menciona que el rango de pH óptimo para estas bacterias está entre 6 y 9 (Batabyal, 2015), eso incluye las aguas dulces en general. Las lecturas de pH de los lugares de muestreo estuvieron dentro del rango: Chifrón 8 y Perka Norte 8.5. La salinidad podría ser un factor de diferencia importante para los vibrios, pero cuando existe una concentración adecuada de nutrientes en los ambientes de agua dulce, la salinidad pasa a ser un factor no primordial para estos microorganismos (Aulet *et al*, 2007). Algunos otros parámetros analizados fueron: alcalinidad, 110 mg/L para Chifrón y 115 mg/L para Perka Norte, los cuales se encuentran dentro del rango de alcalinidad para fuentes de agua dulce; dureza, 340 mg/L en Chifrón y 320 mg/L en Perka Norte, que son valores considerados para aguas muy duras; y oxígeno disuelto, 6.7 mg/L en Chifrón y 8 mg/L en Perka Norte, que son medidas por encima del mínimo requerido para que habite la mayoría de los peces (Murphy, 2005).

A pesar de que las aguas de lagos altoandinos no tienen un gran contenido de nutrientes, el Titicaca si presenta una rica flora y fauna. Esta característica se debe a que sus aguas no son tan frías para la altitud donde se encuentra (Constantini *et al*, 2004), es por ello que habría posibilidad de que los vibrios sobrevivan en este cuerpo de agua. En caso de estrés ambiental, es decir, cuando alguno de los factores ambientales importantes no está en sus niveles óptimos, *V. cholerae* podría entrar en el estado viable no cultivable (VNC). Se le otorga esta denominación porque mantiene la capacidad de realizar funciones metabólicas y formar colonias, pero no puede aislarse mediante métodos de cultivo en el laboratorio (Borroto, 1997).

La bacteria *V. cholerae* en estado VNC se adhiere a la superficie de especies de fitoplancton y zooplancton, así como al intestino de peces, la superficie quitinosa de ostras, cangrejos y camarones y a la superficie de sedimentos de materia orgánica e inorgánica, en los cuales puede encontrar nutrientes para su metabolismo (Borroto, 1997). Se menciona también que puede concentrarse por adherencia en plantas macrófitas de agua dulce, especies de algas verdes y especies de algas verdiazules (Islam *et al*, 1990; Tamplin *et al*, 1990). El lago Titicaca cuenta con copépodos, plancton, cianobacterias y macrófitas, entre ellas, algas verdes y diatomeas (Dejoux e Iltis, 1991; Leon y Young, 1996), los cuales podrían actuar como reservorios.

Se ha demostrado que el mucus de la piel de las ranas tiene componentes llamados AMPs, entre ellos polipéptidos que poseen facultades antibacterianas y farmacológicas que impiden la proliferación de bacterias e incluso les causan la muerte (Haslam *et al*, 2013). Respecto al hallazgo de vibrios en piel de *T. culeus* de Ederly (2015), este pudo deberse a que las ranas decomisadas se encontraban en mal estado y en agua no adecuada, lo cual pudo permitir la contaminación y supervivencia de estas bacterias en la piel de las ranas.

CONCLUSIONES

No se encontró bacterias del género *Vibrio* en los hisopados de la piel de las ranas del Titicaca capturadas; sin embargo, no se puede descartar su presencia debido a diversos factores, como que el número de muestras tomadas no fue muy grande.

Para conocer la presencia de bacterias del género *Vibrio* en el lago Titicaca, sería recomendable realizar estudios en agua, sedimento, flora y fauna del lago, tal como señalan otros autores. Del mismo modo, utilizar técnicas de amplificación de ADN para tener resultados más precisos.

Las especies *Shewanella* sp. y *Aeromonas hydrophila*, encontradas en este estudio, podrían causar cuadros infecciosos de ser ingeridas por seres humanos, por lo que se recomienda no consumir los jugos o extractos de rana como se preparan actualmente.

BIBLIOGRAFÍA

- Aaronson X. 2014. Peru's Erection Vendors Are Driving the Scrotum Frog to Extinction [Documental]. Motherboard.
- Aguilar C, Ramirez C, Rivera D, Siu-Ting K, Suarez J, Torres C. 2010. Anfibios andinos del Perú fuera de Áreas Naturales Protegidas: Amenazas y estado de conservación. *Revista Peruana de Biología*, 17(1).
- Aguirre AA, Lampo M. 2006. Protocolo de bioseguridad y cuarentena para prevenir la transmisión de enfermedades en anfibios. En: Protocolo de bioseguridad y cuarentena para prevenir la transmisión de enfermedades en anfibios. Bogotá, DC - Colombia. p. 72-93.
- Allen WR. 1922. Notes on the Andean Frog, *Telmatobius culeus* (Garman). *Copeia*, 108: 52-54.
- Aulet O, Silva C, Fraga SG, Pichel M, Cangemi R, Gaudio C, *et al.* 2007. Detection of viable and viable nonculturable *Vibrio cholerae* O1 through cultures and immunofluorescence in the Tucumán rivers, Argentina. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 40(4): 385-390.
- [ALT y PNUD] Autoridad Binacional del Lago Titicaca, Programa de Naciones Unidas Para el Desarrollo. 2000. Evaluación de la información disponible de suri, pisaca y rana gigante del lago. En: Proyecto Conservación de la biodiversidad en la cuenca del lago Titicaca – Desaguadero – Poopó - Salar de Coipasa (TDPS). Subcontrato 21.18. 108 p.
- [ALT y PNUD] Autoridad Binacional del Lago Titicaca, Programa de Naciones Unidas Para el Desarrollo. 2002. Evaluación de la población de la rana gigante del lago, *Telmatobius culeus*. Volumen I. En: Proyecto Conservación de la biodiversidad en la cuenca del lago Titicaca – Desaguadero – Poopó - Salar de Coipasa (TDPS). Subcontrato 21.22. 227 p.
- [ALT y PNUD] Autoridad Binacional del Lago Titicaca, Programa de Naciones Unidas Para el Desarrollo. 2002. Evaluación de la población de la rana gigante del lago, *Telmatobius culeus*. Volumen II. En: Proyecto Conservación de la biodiversidad en la cuenca del lago Titicaca – Desaguadero – Poopó - Salar de Coipasa (TDPS). Subcontrato 21.22. 126 p.
- Batabyal P. 2015. Characterization of *Vibrio cholerae* isolated from riverine and estuarine environs of South Bengal with special reference to ecological dynamics. Tesis doctoral. Calcuta: University of Calcutta. [Internet]. [Citado 24 de junio de 2018]. Disponible en: <http://shodhganga.inflibnet.ac.in:8080/jspui/handle/10603/171456>
- Beliaev AS, Saffarini DA. 1998. *Shewanella putrefaciens* mtrB Encodes an Outer Membrane Protein Required for Fe (III) and Mn (IV) Reduction. *Journal of Bacteriology*, 180(23): 6292-6297.
- Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ. 2014. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases E-Book. Elsevier Health Sciences, 5095 p.
- Berenguel RA. 2014. Presencia de *Batrachochytrium dendrobatidis* en la rana gigante del lago Titicaca (*Telmatobius culeus*) Tesis de pregrado. Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia. [Internet]. [Citado 28 de enero de 2020]. Disponible en: <http://repositorio.upch.edu.pe/handle/upch/57>
- Blake PA, Weaver RE, Hollis DG. 1980. Diseases of Humans (Other than Cholera) Caused by Vibrios. *Annual Reviews of Microbiology*, 34(1): 341-367.
- Borroto RJ. 1997. La ecología de *Vibrio cholerae* serogrupo 01 en ambientes acuáticos. *Rev Panam Salud Pública*, 1: 3-8.

- Borroto RJ. 1998. Supervivencia de *Vibrio cholerae* O1 en agua dulce superficial y cólera endémico: una hipótesis geoecológica. *Rev Panam Salud Pública*, 4: 371-374.
- Cai J, Chen H, Thompson KD, Li C. 2006. Isolation and identification of *Shewanella algae* and its pathogenic effects on post-larvae of abalone *Haliotis diversicolor supertexta*. *Journal of Fish Diseases*, 29(8): 505-508.
- Cevallos A, Guillén A, Gamarra G, Roque M. 2002. Determinación de la Viabilidad de *Vibrio cholerae* O1 en los medios de transporte Amies y Stuart. *Ciencia e Investigación*, 5(1): 15-22.
- Costantini ML, Sabetta L, Mancinelli G, Rossi L. 2004. Spatial variability of the decomposition rate of *Schoenoplectus tatora* in a polluted area of Lake Titicaca. *Journal of Tropical Ecology*, 20(3): 325-335.
- Dalynn Biologicals. 2014. O129 DISKS [Internet]. [Citado 5 de junio de 2018]. Disponible en: http://www.dalynn.com/dyn/ck_assets/files/tech/DD10.pdf
- Dejoux C, Iltis A. 1991. El Lago Titicaca: Síntesis del Conocimiento Limnológico Actual. La Paz, Bolivia: IRD Editions, 589 p.
- Edery SJ. 2015. Bacterias aisladas de la piel de la rana gigante del Titicaca (*Telmatobius culeus*) en condiciones de cautiverio. Tesis de pregrado. Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia. 20 p.
- El-Barbary MI. 2017. First recording of *Shewanella putrefaciens* in cultured *Oreochromis niloticus* and its identification by 16Sr RNA in Egypt. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 43(1): 101-107.
- Fu X, Liang W, Du P, Yan M, Kan B. 2014. Transcript changes in *Vibrio cholerae* in response to salt stress. *Gut Pathog*, 6(1): 47
- Fuentes F, Massol-Deyá A. 2002. Manual de Laboratorio: Ecología de Microorganismos. Universidad de Puerto Rico. [Internet]. [Citado 17 de abril de 2018]. Disponible en: <https://www.uprm.edu/biology/profs/massol/manual>
- García IM. 1997. Diagnóstico de las infecciones humanas causadas por especies halófilas del género *Vibrio*. Control Calidad SEIMC [Internet]. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/vibrio.pdf>
- Garrrity G. 2005. Family I. Vibrionaceae. In: Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume Two: The Proteobacteria Part B: The Gammaproteobacteria*. Springer, New York. p 491–545.
- Gavilán RG, Martínez-Urtaza J. 2011. Factores ambientales vinculados con la aparición y dispersión de las epidemias de *Vibrio* en América del Sur. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 28(1): 109-115.
- Ghorbanzadeh N, Kumar R, Lee S, Park H-S, Jeon B-H. 2018. Impact of *Shewanella oneidensis* on heavy metals remobilization under reductive conditions in soil of Guilan Province, Iran. *Geosci J*, 22(3): 423-432.
- [GRP] Gobierno Regional de Puno. 2014. Ordenanza Regional N° 020-2013-GRP-CRP [Internet]. [Citado 17 de octubre de 2019]. Disponible en: <http://www.regionpuno.gob.pe/ordenanzas-regionales/>

- Haslam IS, Roubos EW, Mangoni ML, Yoshizato K, Vaudry H, Kloepper JE, *et al.* 2013. From frog integument to human skin: dermatological perspectives from frog skin biology. *Biological Reviews*, 89(3): 618-655.
- Huang K-C, Wen-Wei Hsu R. 2005. *Vibrio fluvialis* Hemorrhagic Cellulitis and Cerebritis. *Clin Infect Dis*, 40(9): 75-77.
- Hutchison VH, Haines HB, Engbretson G. 1976. Aquatic life at high altitude: Respiratory adaptations in the lake Titicaca frog, *Telmatobius culeus*. *Respiration Physiology*, 27(1): 115-129.
- Islam MS, Drasar BS, Bradley DJ. 1990. Survival of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 with a common duckweed, *Lemna minor*, in artificial aquatic ecosystems. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 84(3): 422-424.
- IUCN SSC Amphibian Specialist Group. 2020. *Telmatobius culeus* (errata version published in 2020). The IUCN Red List of Threatened Species 2020: e.T57334A178948447. [Internet]. [Citado 16 de mayo de 2021]. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2020-2.RLTS.T57334A178948447.en>.
- Janda JM, Abbott SL. 2012. The genus *Shewanella*: from the briny depths below to human pathogen. *Critical Reviews in Microbiology*, 40(4): 293-312.
- Kaysner CA, De Paola A, Jones J. 2004. Bacteriological Analytical Manual (BAM) Chapter 9: *Vibrio* [Internet]. [Citado 15 de mayo de 2018]. Disponible en: <https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070830.htm>
- Kozińska A y Pekala A. 2004. First isolation of *Shewanella putrefaciens* from freshwater fish – a potential new pathogen of fish. *Bull Eur Ass Fish Pathol*, 24(4): 189-193
- Leon B, Young KR. 1996. Aquatic plants of Peru: diversity, distribution and conservation. *Biodivers Conserv*, 5(10): 1169-1190.
- Lesmana M, Richie E, Subekti D, Simanjuntak C, Walz SE. 1997. Comparison of Direct-Plating and Enrichment Methods for Isolation of *Vibrio cholerae* from Diarrhea Patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(7): 1856-1858.
- Liu PY, Shi ZY, Lin CF, Huang JA, Liu JW, Chan KW, *et al.* 2012. *Shewanella* infection of snake bites: a twelve-year retrospective study. *Clinics*, 67(5): 431-435.
- Mantilla Mendoza B. 2018. Reproducción de la rana gigante (*Telmatobius culeus*, Garman 1875) del lago Titicaca en ambientes controlados, Puno. Tesis doctoral. Puno: Universidad Nacional del Altiplano. [Internet]. [Citado 28 de enero de 2020]. Disponible en: <http://repositorio.unap.edu.pe/handle/UNAP/9193>
- McClure PJ, Cole MB, Davies KW. 1994. An example of the stages in the development of a predictive mathematical model for microbial growth: the effects of NaCl, pH and temperature on the growth of *Aeromonas hydrophila*. *International Journal of Food Microbiology*, 23(3): 359-375.
- [MINAGRI] Ministerio de Agricultura y Riego. 2014. Decreto Supremo N°004-2014-MINAGRI. Decreto Supremo que aprueba la actualización de la lista de clasificación y categorización de las especies amenazadas de fauna silvestre legalmente protegidas. *El Peruano*, 520497-520504. [Internet]. [Citado 8 de marzo de 2018]. Disponible en: <http://minagri.gob.pe/portal/decreto-supremo/ds-2014/10837-decreto-supremo-n-004-2014-minagri>
- [MINAM] Ministerio del ambiente. 2014. Estado de la calidad ambiental de la cuenca del lago Titicaca ámbito peruano [Internet]. [Citado 17 de abril de 2018]. Disponible en:

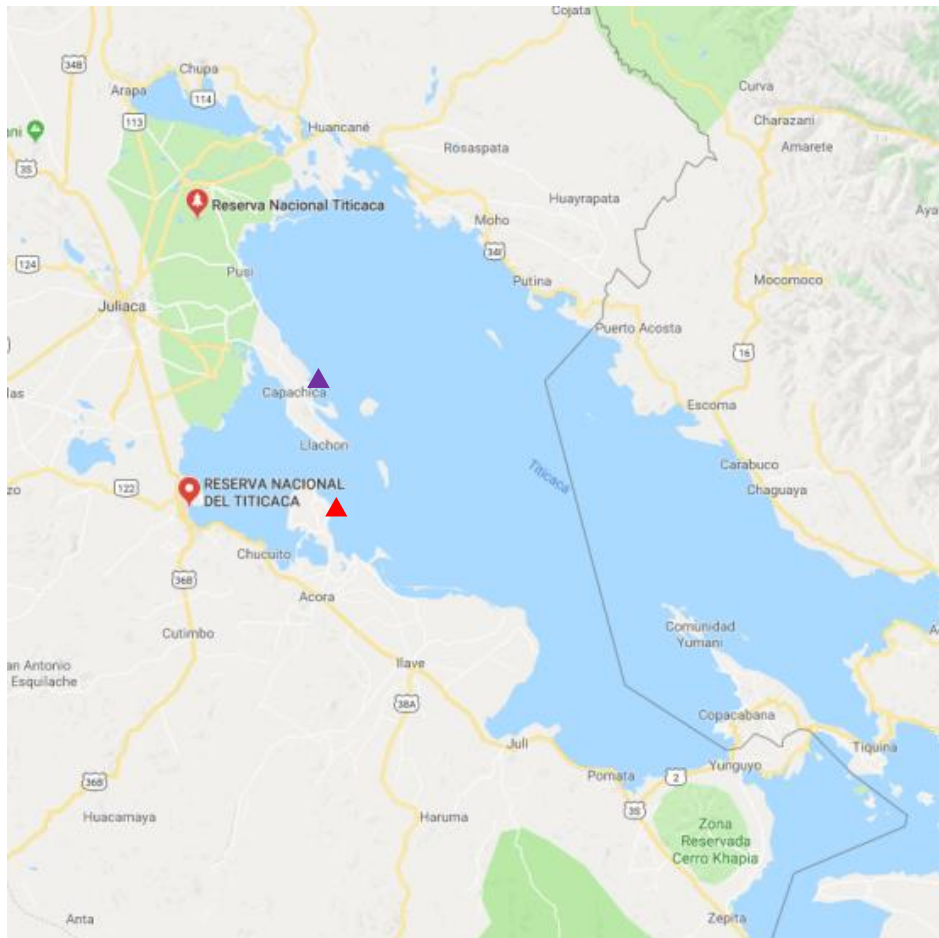
<http://www.minam.gob.pe/puno/wp-content/uploads/sites/55/2014/02/ESTUDIO-DEL-ESTADO-DE-LA-CALIDAD-AMBIENTAL-CUENCA-DEL-TITICACA.pdf>

- Murphy, S. 2005. "Boulder area sustainability information network, water quality". [Internet]. [Citado 24 de junio de 2021]. Disponible en: http://ben.boulder.co.us/basin/watershed/wqi_info.html
- Nath R, Saikia L, Choudhury G, Das PP. 2011. Isolation of *Shewanella algae* from rectal swabs of patients with bloody diarrhea. Indian Journal of Medical Microbiology, 29(4): 422.
- [NOAA] National Oceanic and Atmospheric Administration. 2007. NOAA's National Ocean Service Education: Estuaries [Internet]. [Citado 30 de abril de 2018]. Disponible en: https://oceanservice.noaa.gov/education/kits/estuaries/estuaries01_what.html
- Nealson KH, Scott J. 2006. Ecophysiology of the Genus *Shewanella*. En: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E, editores. The Prokaryotes: Volume 6: Proteobacteria: Gamma Subclass. New York, NY: Springer New York. p 1133-1151.
- Ng IS, Ndivi CI, Zhou Y, Wu X. 2015. Cultural optimization and metal effects of *Shewanella xiamenensis* BC01 growth and swarming motility. Bioresources and Bioprocessing, 2(1): 28.
- Pazzaglia G, Lesmana M, Tjaniadi P, Subekti D, Kay B. 1993. Use of vaginal tampons in sewer surveys for non-O1. *Vibrio cholerae*. Appl Environ Microbiol, 59(8): 2740-2742.
- [UNEP y OEA] Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente, Organización de los Estados Americanos. 1996. Diagnóstico Ambiental del Sistema Titicaca-Desaguadero-Poopo-Salar de Coipasa (Sistema TDPS) Bolivia-Perú. [Internet]. [Citado 4 de mayo de 2018]. Disponible en: <http://siar.minam.gob.pe/puno/documentos/diagnostico-ambiental-sistema-titicaca-desaguadero-poopo-salar>
- Rafidah J, Ong BL, Saroja S. 1990. Outbreak of «red leg» - an *Aeromonas hydrophila* infection in frogs. Jurnal Veterinar Malaysia, 2(2): 139-142.
- Rajkowski KT. 2009. Biofilms in fish processing. En: Fratamico PM, Annous BA, Gunther NW, editores. Biofilms in the Food and Beverage Industries [Internet]. Oxford: Woodhead Publishing; [Citado 10 de julio de 2018]. p 499-516. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781845694777500193>
- Ramamurthy T, Chowdhury G, Pazhani GP, Shinoda S. 2014. *Vibrio fluvialis*: an emerging human pathogen. Front Microbiol, 5: 91.
- Ramos VE, Quispe JA, Elias RK. 2019. Evaluación de la abundancia relativa de *Telmatobius culeus* en la zona litoral del lago Titicaca, Perú. Revista Peruana de Biología, 26(4): 475-480.
- Reading RR, Weaver TJ, Garcia JR, Elias RK, Herbert MT, Cortez C, et al. 2011. Taller para establecer la Estrategia de Conservación de la Rana del Titicaca (*Telmatobius culeus*). Puno: Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Altiplano. 170 p.
- Saeed MO, Alamoudi MM, Al-Harbi AH. 1987. A *Pseudomonas* associated with disease in cultured rabbitfish *Siganus rivulatus* in the Red Sea. Dis aquat Org, 3: 177-180
- Shek KC, Tsui KL, Lam KK, Crow P, Ng KHL, Ades G, et al. 2009. Oral bacterial flora of the Chinese cobra (*Naja atra*) and bamboo pit viper (*Trimeresurus albolabris*) in Hong Kong SAR, China. Hong Kong Med J, 15(3): 183-190.
- Simidu U, Kita-Tsukamoto K, Yasumoto T, Yotsu M. 1990 Taxonomy of four marine bacterial strains that produce tetrodotoxin. Int J Syst Bacteriol, 40(4): 331-336.

- Takahashi Y, Kajiwaki T, Itami T. 1985. Characteristics of Vibriostatic Agent-Sensitive *Aeromonas hydrophila* isolated from *Plecoglossus altivelis* and its Pathogenicity. Nippon Suisan Gakkaishi, 52(10): 1727-1733.
- Tamplin M, Parodi C. 1991. Environmental spread of *Vibrio cholerae* in Peru. The Lancet, 338(8776): 1216-1217.
- Tamplin ML, Gauzens AL, Huq A, Sack DA, Colwell RR. 1990. Attachment of *Vibrio cholerae* serogroup O1 to zooplankton and phytoplankton of Bangladesh waters. Appl Environ Microbiol, 56(6): 1977-1980.
- Thamdrup B. 2000. Bacterial Manganese and Iron Reduction in Aquatic Sediments. En: Schink B, editor. Advances in Microbial Ecology. vol. 16. Boston, MA: Springer US. p 41-84.
- Uh Y, Park J-S, Hwang G-Y, Jang I-H, Yoon K-J, Park H-C, *et al.* 2001. *Vibrio alginolyticus* acute gastroenteritis: report of two cases. Clinical Microbiology and Infection, 7(2): 104-106.
- [UICN y TRAFFIC] Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza, TRAFFIC. 2016. Análisis de las Propuestas de Enmienda a los Apéndices de la CITES de UICN/TRAFFIC. Preparados por el Programa de Especies de la UICN y TRAFFIC para la Decimoséptima Reunión de la Conferencia de las Partes en la CITES. UICN, Gland, Suiza.
- Vellard J. 1951. Estudios sobre batracios andinos, El grupo *Telmatobius* y formas afines. Memorias del Museo de Historia Natural «Javier Prado» UNMSM. I [Internet]. p 1-98. [Citado 4 de mayo de 2018]. Disponible en: <https://museohn.unmsm.edu.pe/memorias.html>
- Vignier N, Barreau M, Olive C, Baubion E, Théodose R, Hochedez P, *et al.* 2013. Human Infection with *Shewanella putrefaciens* and *S. algae*: Report of 16 Cases in Martinique and Review of the Literature. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 89(1): 151-156.
- Vinh DC, Embil JM. 2005. Rapidly progressive soft tissue infections. The Lancet Infectious Diseases, 5(8): 501-513.
- Watson AS, Fitzgerald AL, Baldeón OJD. 2017. Diet composition and prey selection of *Telmatobius macrostomus*, the Junín giant frog. Endangered Species Research, 32: 117-121.

ANEXOS

Figura 1.- Localización de los lugares donde se capturaron las ranas para la colecta de muestras.



▲ Zona de muestreo 1: Perka Norte. ▲ Zona de muestreo 2: Chifrón.

Imagen extraída de Google maps.