

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTI *BATRACHOCHYTRIUM DENDROBATIDIS*  
POR PARTE DE LA MICROBIOTA PRESENTE EN LA PIEL DE DOS ESPECIES DE  
RANAS ANDINAS**



**LAURA ALEJANDRA ESCOBAR IBARRA**

**TRABAJO DE GRADO**

**Presentado como requisito para optar el título de**

**Bióloga**

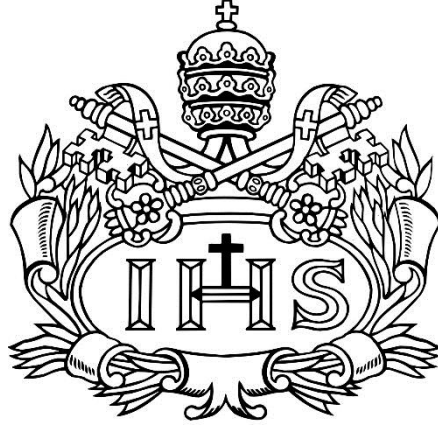
**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**CARRERA DE BIOLOGÍA**

**BOGOTÁ, D.C. 2016**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTI *BATRACHOCHYTRIUM DENDROBATIDIS*  
POR PARTE DE LA MICROBIOTA PRESENTE EN LA PIEL DE DOS ESPECIES DE  
RANAS ANDINAS**



**LAURA ALEJANDRA ESCOBAR IBARRA**

**APROBADO**

---

**Concepción Puerta B., PhD**

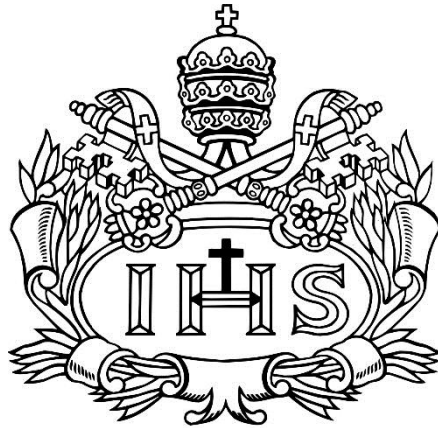
**Decana académica**

---

**Jorge Hernán Jácome R., PhD**

**Director Carrera de Biología**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTI *BATRACHOCHYTRIUM DENDROBATIDIS*  
POR PARTE DE LA MICROBIOTA PRESENTE EN LA PIEL DE DOS ESPECIES DE  
RANAS ANDINAS**



**LAURA ALEJANDRA ESCOBAR IBARRA**

**APROBADO**

---

**Sandra Victoria Flechas M.Sc**

**Directora**

---

**María Ximena Rodríguez B., PhD**

**Jurado**

---

**Wilson Terán Pérez, PhD**

**Jurado**

## **NOTA DE ADVERTENCIA**

*“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por los alumnos en sus trabajos de tesis. Sólo velará porque no publique nada contrario al dogma y a la moral Católica y porque la tesis no contenga ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.*

Artículo 23 de la resolución N° 13 de Julio de 1946.

## AGRADECIMIENTOS

A Dios que me ha regalado la oportunidad de estar donde hoy me encuentro y ha llenado mi vida de bendiciones innumerables.

A mis padres que todo les debo por hacer todo y más por mí, por ser quienes siempre están dispuestos a ayudarme, a prestarme su atención y apoyo incondicional. Por todos sus consejos, aliento y porque nada me han negado.

A mi hija Abril Luciana por ser el motor y la fuente de energía que no me deja caer y me recuerda las razones por las que a pesar de los obstáculos debo seguir sin desfallecer.

A Juan Felipe por ser mi compañero, mi ayudante, mi consentidor, mi apoyo, pero sobre todo por ser mi crítico.

A mis demás familiares y amigos por siempre estar pendientes y dándome ánimo.

A mi directora Vicky Flechas (Universidad de los Andes) por enseñarme tantas cosas, por estar siempre dispuesta a escucharme, ayudarme, a motivarme y por su gran calidez humana.

Al profesor Alejandro Acosta González (Universidad de la Sabana) por bríndame sus conocimientos y asesoría, por estar en todo momento presto a responder mis dudas que permitieron el buen desarrollo de esta investigación.

A la profesora Claudia Parra y a la investigadora Adriana Sánchez (Pontificia Universidad Javeriana), por ofrecerme su conocimiento, asesoría y por prestarme los equipos que fueron vitales para culminar con éxito esta investigación.

A la Universidad de los Andes por abrirme sus puertas y darme la oportunidad de encontrar un ambiente de trabajo servicial, cálido y amigable.

Al profesor Andrew J. Crawford (Universidad de los Andes) por permitirme hacer uso de su laboratorio, equipos y espacios que se convirtieron en mi casa.

A los estudiantes del laboratorio Biomjics (Universidad de los Andes) por su alegría y colaboración y a todas las personas que de una forma u otra tuvieron que ver en esta investigación y que contribuyeron para que fuera posible.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>RESUMEN</b> .....	<b>8</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>8</b>
<b>JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	<b>10</b>
<b>MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>11</b>
Importancia de los anfibios.....	11
Estado actual de las poblaciones de anfibios.....	12
Principales amenazas a los anfibios .....	12
Quitridiomycosis.....	13
<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> .....	14
Distribución de Bd.....	15
Mecanismos de defensa de los anfibios contra Bd.....	16
Tratamientos para combatir la quitridiomycosis.....	16
Probióticos como alternativa para el tratamiento de la quitridiomycosis.....	17
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>18</b>
Objetivo General.....	18
Objetivos específicos.....	18
<b>MÉTODOS</b> .....	<b>18</b>
Área de estudio y captura de los anuros .....	18
Aislamiento e identificación de la microbiota bacteriana de la piel.....	19
Identificación de morfotipos no identificados con MALDI-TOF .....	20
Determinación de la actividad anti-Bd mediante pruebas de antagonismo.....	21
Prueba de antagonismo por enfrentamiento directo .....	23
Análisis de datos .....	23
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>24</b>
Registro de los individuos capturados .....	24
Aislamiento e identificación de la microbiota bacteriana de la piel.....	24
Análisis de diversidad.....	26
Bacterias con efecto de inhibición contra Bd .....	27
Diferencias entre las bacterias que inhiben Bd.....	31
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>31</b>

**RECOMENDACIONES.....36**  
**BIBLIOGRAFÍA.....36**  
**ANEXOS .....1**  
Listado de secuencias consenso obtenidas mediante la secuenciación del gen 16S. .... 1  
Fotografía representativa de los geles de agarosa para visualizar los productos de PCR ..... 19  
Listado total de las especies encontradas en todos los individuos muestreados de *R. palmatus* y *D. labialis*. ..... 20

## RESUMEN

La quitridiomycosis es una de las causas de la extinción masiva de los anfibios a nivel mundial. Pese a la letalidad que ha mostrado esta enfermedad, existen poblaciones de anuros que cohabitan con el hongo que la causa (*Batrachochytrium dendrobatidis*), sin presentar disminuciones poblacionales. Se cree que la microbiota presente en la piel de estas poblaciones puede presentar un efecto inhibitorio sobre *Batrachochytrium dendrobatidis*, lo cual explicaría por qué algunos grupos persisten a pesar de la presencia del patógeno. El objetivo de esta investigación fue determinar la actividad anti-*Batrachochytrium dendrobatidis* de la microbiota cultivable presente en la epidermis de *Dendrosophus labialis* y *Rheobates palmatus*, especies que co-ocurren con el hongo en una charca en el municipio de Ubaque, Cundinamarca (Colombia). Para recuperar una mayor diversidad de microorganismos se usaron dos medios de cultivo. Posteriormente, se evaluó la actividad antagonista de las especies aisladas a través de microensayos en placas de Elisa. En total se obtuvieron 615 morfotipos que fueron clasificados mediante MALDITOF y el gen ARNr 16S en 93 especies pertenecientes a 35 géneros, dentro de las que predominan especies pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Chryseobacterium*, y *Arthrobacter*. Se calcularon los índices de Shannon y Simpson que indicaron una alta diversidad de especies bacterianas y diferencias entre la composición de la microbiota entre las especies de anuros. En cuanto a las pruebas de antagonismo, el 52% de las especies identificadas presentaron actividad anti-Bd, siendo diferentes entre los estadios de desarrollo y las especies de anuros evaluadas. Esto indicaría que la microbiota epidérmica cultivable tiene una capacidad antifúngica que confiere la resistencia y permite que estas dos especies de anfibios coexistan con el hongo, sin embargo, las especies que cumplen un efecto en la inhibición de Bd varían dependiendo del estadio.

## INTRODUCCIÓN

La microbiota presente en todos los organismos está compuesta por diferentes especies que pueden cambiar a lo largo de las etapas del desarrollo y que en el caso de los animales puede ser influenciado por muchos factores incluyendo la dieta, los ciclos hormonales o cuadros patológicos (Gerber 2014; Hacquard et al. 2015). Los microorganismos simbioses pueden generar una serie de respuestas en el hospedero, que van desde la adquisición de resistencia a algunas enfermedades hasta la predisposición a adquirir otras, de tal manera que el microbioma



puede ser considerado como un agente modulador en muchos procesos infecciosos (Salminen et al. 2005; Clay 2014).

El estudio de las interacciones de los microorganismos ha cobrado importancia como un mecanismo coevolutivo en la defensa contra patógenos (Clay 2014). En los anfibios, debido al declive poblacional y consecuente pérdida de especies por la quitridiomycosis (entre otras causas), este es un tema de interés prioritario (Chanson et al. 2012). La quitridiomycosis es una enfermedad infecciosa causada por el hongo patógeno *Batrachochytrium dendrobatidis* (en adelante Bd) (Berger et al. 1998; Berger et al. 1999; Longcore et al. 1999). La enfermedad produce letargo, pérdida de apetito y cambios de comportamiento y finalmente la muerte debido a un desequilibrio osmótico que afecta el intercambio de iones a través de la piel (Berger et al. 1999; Voyles et al. 2009; Campbell et al. 2012). Bd ha logrado vencer el desarrollado sistema inmunológico de los anfibios, por esta razón, un gran número de especies se han visto afectadas (Fites et al. 2013; Rollins-Smith et al. 2015).

Varios estudios han demostrado el papel de las bacterias como inhibidoras del crecimiento de Bd lo cual permite contrarrestar los efectos letales del patógeno (Flechas et al. 2012; Woodhams et al. 2014; Becker et al. 2015b). El descubrimiento de estos efectos de las bacterias cutáneas sobre Bd, ha impulsado la investigación orientada a generar una nueva alternativa de tratamiento contra la quitridiomycosis, fundamentada en el aislamiento y la bioaumentación de bacterias con capacidad anti Bd (Harris et al. 2009; Woodhams et al. 2011; Bletz et al. 2014).

En este trabajo se usaron como modelo de estudio a *Dendropsophus labialis* y *Rheobates palmatus*, dos especies de ranas andinas que co-ocurren con Bd en una charca en Cáqueza pero no manifiestan síntomas de la enfermedad. Este sistema ofrece un escenario ideal para entender por qué estas especies pueden sobrevivir al patógeno. Para esto se realizó un aislamiento de bacterias cutáneas usando dos medios de cultivo (agar nutritivo y agar avena). Cada morfotipo fue purificado y conservado a -80°C. En total se aislaron 615 morfotipos que fueron identificados usando espectrometría de masas en el sistema MALDI-TOF o mediante secuenciación del gen 16S rRNA. Se encontró que los géneros más predominantes fueron *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Chryseobacterium*, y *Arthrobacter*. Se realizaron experimentos de antagonismo con el fin de determinar cuáles bacterias presentaban actividad antifúngica. En total 56 especies de bacterias

inhibieron el crecimiento del patógeno, 32 exclusivas de *Rheobates palmatus*, 15 en *Dendropsophus labialis* y nueve en ambas especies.

## **JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

En las últimas décadas se han reportado grandes disminuciones en las poblaciones de anfibios a nivel mundial (Laurance 1996; Berger et al. 1998; Green 2003; Muths et al. 2003; Beebee y Griffiths 2005). Factores como el cambio climático, contaminantes ambientales, modificación del hábitat, introducción de especies y enfermedades producidas por patógenos, son responsables de la disminución de las especies y poblaciones de anfibios (Alford y Richards 1999; Wake y Vredenburg 2008; Hayes et al. 2010). Esto ha generado una pérdida que desestabiliza gravemente los ecosistemas ya que dadas las diferencias funcionales que desempeñan las larvas y los adultos en sus microhábitats respectivos, la pérdida de una sola especie es comparable con la pérdida de dos especies (Whiles et al. 2006).

Aunque varias razones son consideradas responsables de la desaparición de los anfibios, los reportes de muertes masivas en áreas protegidas y/o sin problemas de pérdida de hábitat son particularmente alarmantes (Berger et al. 1998; Berger et al. 1999). Las enfermedades ocasionadas por patógenos son en este momento uno de los principales focos de atención por parte de la comunidad científica (Belden y Harris 2007), y dentro de estas patologías se encuentran las enfermedades infecciosas como el ranavirus y la quitridiomycosis (Muths et al. 2003; Beebee y Griffiths 2005; Belden y Harris 2007; Mendoza et al. 2015). La primera es producida por un virus perteneciente a la familia Iridoviridae y aunque es considerada letal para muchas especies, afecta relativamente pocas, siendo más susceptibles las salamandras pertenecientes a la familia Ambystomatidae y ranas de la familia Ranidae (Jancovich et al. 2001; Pearman y Garner 2005; Latney y Klaphake 2013). La quitridiomycosis por otra parte, ha sido relacionada con eventos de mortalidad masiva y sin precedentes afectando a una gran variedad de familias en todos los continentes con más de 500 especies reportadas a nivel mundial (Olson et al. 2013). La enfermedad causada por Bd genera un desbalance osmótico ocasionado por la pérdida de permeabilidad epidérmica, que finalmente conduce a la muerte por paro cardíaco (Berger et al. 1999; Belden y Harris 2007; Voyles et al. 2009; Baitchman y Pessier 2013).

Además de esto, Bd afecta el sistema inmune del hospedero alterando la morfología de los linfocitos y generando una apoptosis de los mismos (Fites et al. 2013).

Se ha reportado que individuos de algunas especies de ranas son portadoras asintomáticas de la infección (Daszak et al. 2004; Padgett et al. 2011). Existen varias hipótesis que pueden explicar este hecho: i) que la cepa de Bd no sea patógena (Rosenblum et al. 2013); ii) que condiciones ambientales como la temperatura ayudan a controlar la capacidad de colonización y reproducción del patógeno (Rowley et al. 2013) y iii) se atribuye la resistencia a la enfermedad a la microbiota simbiote, que puede inhibir o retrasar el crecimiento del hongo (Woodhams et al. 2007; Becker y Harris 2010; Flechas et al. 2012; Woodhams et al. 2015). Por lo tanto, el uso de microorganismos cutáneos naturales parece prometedor como posible tratamiento contra la quitridiomycosis (Becker et al. 2011; Küng et al. 2014; Woodhams et al. 2011). En este estudio se usaron dos especies de ranas que conviven con el patógeno a pesar de las altas tasas de infección. Este sistema ofrece un escenario ideal para entender cómo poblaciones naturales pueden combatir al hongo y de esta manera desarrollar mejores estrategias para contrarrestar los efectos letales del patógeno en especies neotropicales.

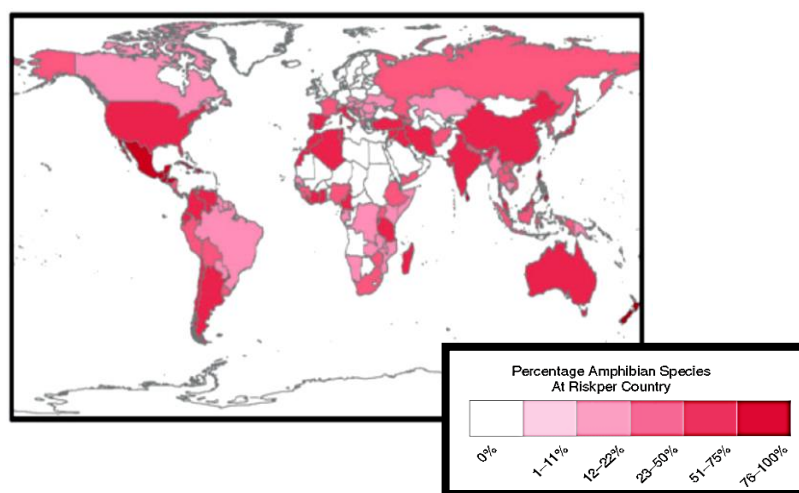
## **MARCO TEÓRICO**

### ***Importancia de los anfibios***

Los anfibios son los vertebrados más diversos con alrededor de 7,428 especies en el mundo (AmphibiaWeb 2015). Colombia cuenta con 711 especies, siendo el segundo país con mayor diversidad después de Brasil (SiB 2014; AmphibiaWeb 2015). Los anfibios cumplen funciones ecológicas muy específicas, a nivel de suelos pueden contribuir con los ciclos de nutrientes manteniendo su disponibilidad y favoreciendo el reciclaje de elementos esenciales (Beard et al. 2002; Hocking y Babbitt 2014). De igual manera, al desarrollarse en dos medios (acuático y terrestre), presentan una gran eficiencia para convertir energía en biomasa y transmitirla a los niveles siguientes de la cadena trófica (Edwards et al. 2014; Hocking y Babbitt 2014). También actúan como predadores, por lo cual pueden ser controladores biológicos de insectos (Hammer y McDonnell 2008; Cortéz et al. 2015). Además pueden actuar como dispersores de semillas (Hocking y Babbitt 2014) y aportan sustancias de importancia farmacéutica (Fox y Serrano 2007; King 2011).

### ***Estado actual de las poblaciones de anfibios***

Algunos autores mencionan que estamos experimentando la sexta extinción en masa (Wake y Vredenburg 2008), debido a que el 43% de las especies se encuentran en algún tipo de amenaza a nivel mundial: en peligro crítico (CR), en peligro (EN) y amenazadas (VU) (Figura 1) (Whittaker et al. 2012; Pimm et al. 2014). El Neotrópico es la región más preocupante, ya que hay más de 400 especies en peligro de extinción (AmphibiaWeb 2015). Solamente a nivel nacional el 25% de las especies están catalogadas en la condición de peligro crítico (SiB 2014),



**Figura 1.** Representación geográfica del porcentaje de especies en peligro crítico, en peligro y amenazadas a nivel mundial. Tomado y modificado de Whittaker et al. (2012).

Los anfibios son un grupo especialmente sensible debido a que su piel suave y permeable, de vital importancia para los procesos de osmorregulación y respiración, está protegida solo con una capa de moco que les permite detectar las señales ambientales y absorber oxígeno; esto los hace especialmente susceptibles a los cambios en la calidad de agua y del aire como resultado de diversos contaminantes (Campbell et al. 2012).

### ***Principales amenazas a los anfibios***

La disminución en la población mundial de este grupo se ha atribuido a diferentes factores causales que pueden actuar de manera independiente o sinérgica (Collins y Storfer 2003; Hayles et al. 2010). Dichos factores son: la pérdida de hábitat (Cushman 2006), contaminación con agentes químicos en los cuerpos de agua (Collins y Storfer 2003; Cushman 2006; Hamer y McDonnell 2008), el aumento de la radiación UV-B (Davidson et al. 2001; Davidson et al. 2002), el cambio climático global (Carey y Alexander 2003; D'Amén y Bombi 2009; Ochoa et al. 2012;

Vittoz et al. 2013), la sobreexplotación (Nyström et al. 2007) y las enfermedades infecciosas (Berger et al. 1999; Woodhams et al. 2005; Hayes et al. 2010; Martel et al. 2013).

Las enfermedades provocadas por micro-parásitos han cobrado la atención en esta crisis que sufren los anfibios, y que se han visto relacionados con muertes masivas y extinciones (Belden y Harris 2007). Estas enfermedades tienen diferentes agentes causales, pueden ser de tipos virales, bacterianos, y originados por tremátodos y hongos, en donde las de tipo viral y fúngico son las que han generado mayores niveles de mortalidad (Latney y Klaphake 2013; Vitt y Caldwell 2014).

Las infecciones bacterianas producen una enfermedad comúnmente llamada la enfermedad de la pierna roja que se caracteriza por la presencia de eritemas cutáneos y de los músculos superficiales por la ruptura y dilatación de los capilares (Poll 2009; Pessier 2014). Las causadas por tremátodos por su parte, son infecciones que inducen malformaciones generalmente en las patas traseras de individuos post-metamórficos (Johnson et al. 2001; Hamann y González 2009). Finalmente, se encuentran las enfermedades producidas por hongos, en las que se relaciona las micosis causada por *Saprolegnia ferax*, un oomiceto parásito de peces que afecta los huevos de varios anfibios (Kiesecker y Belden 2001; Groner et al. 2014; Urban et al. 2014). También se encuentra la infección generada por *Basidiobolus ranarum* que ha sido relacionada con la disminución de poblaciones del sapo *Peltophryne lemur* (Crawshaw et al. 2014). Por último, la quitridiomycosis que se ha hecho más conocida por tener graves impactos sobre las poblaciones de anfibios en varios lugares alrededor del mundo (Lips et al. 2006; Hayes et al. 2010; Wytaker et al. 2012). Esta enfermedad incluye a la infección causada por el ya mencionado Bd que se ha reportado en más de 500 especies de anfibios (Olson et al. 2013) y a *Batrachochytrium salamandrivorans* que ataca exclusivamente a salamandras, sin embargo de este último no existe evidencia de que se encuentre en América (Martel et al. 2014; Yap et al. 2015).

### ***Quitridiomycosis***

La quitridiomycosis es una enfermedad infecciosa producida por *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd), un hongo del phylum Chytridiomycota (Longcore et al. 1999). Los anfibios son especialmente vulnerables ya que necesitan mantenerse internamente en un estado hiperosmótico con respecto al medio en el que se desarrollan, mediante una absorción en contra del gradiente de iones Na<sup>+</sup> por las células epidérmicas (Larsen 2011). La infección superficial por Bd bloquea los

canales e inhibe la absorción de  $\text{Na}^+$  a través de la piel, lo que lleva al agotamiento de electrolitos plasmáticos y finalmente a la muerte por paro cardíaco (Voyles et al. 2009). En individuos sanos se produce un proceso natural de muda de su capa celular superficial completamente queratinizada, que se separa de la lámina basal empujada por las nuevas células, posteriormente mueren dentro de un proceso normal llamado ecdisis que puede variar según la especie, sexo y edad (Vitt y Caldwell 2014). Sin embargo en individuos infectados, la patología altera este proceso, generando una hiperplasia de células queratinocíticas y una fusión de las capas de queratina (queratosis), produciendo una pérdida considerable de la permeabilidad de la piel y por lo tanto de su función osmorreguladora que conllevan a la muerte (Voyles et al. 2009; Kilpatrick et al. 2010; Campbell et al. 2012; Baitchman y Pessier 2013).

Adicionalmente, la infección puede manifestar otras sintomatologías que incluyen letargo, debilidad, pérdida del reflejo de enderezamiento, eritema cutáneo en particular en la región ventral y las membranas interdigitales, posturas anormales, decoloración, ulceración y erosión del estrato córneo de la piel, inapetencia, ausencia de comportamiento de escape y una preferencia por permanecer expuestos al sol (Berger et al., 1999; Kilpatrick et al. 2010; Baitchman y Pessier 2013). Finalmente la producción de metiltioadenosina (MTA), triptófano, y un producto oxidado de triptófano, quinurenina (Kyn) por parte del hongo inhibe a las células inmunológicas de los anfibios (linfocitos T y linfocitos B) causando un aumento en el grado de infección (Fites et al. 2013; Mendoza et al. 2015).

### ***Batrachochytrium dendrobatidis***

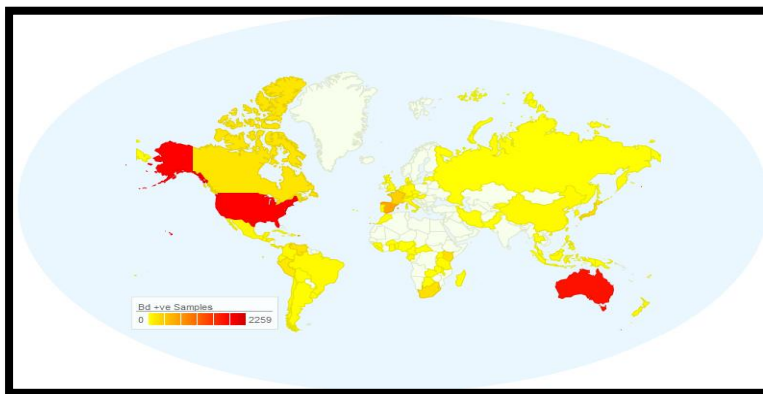
Los quitridiales, son hongos poco evolucionados que carecen de hifas y producen zoosporas flageladas móviles (Longcore et al. 1999). Estos hongos están presentes principalmente en los ambientes acuáticos o húmedos y parasitan principalmente algas, plantas, protozoos o invertebrados (Mutschmann 2015). De tal manera que *Batrachochytrium* está científicamente reconocido como el único género que parasita vertebrados y parece ser específico de anfibios (Berger et al, 1998; Martel et al. 2013). Posee reproducción asexual, en la cual las zoosporas dan origen a un talo, dentro del que se desarrollan los zoosporangios, los cuales, tras un proceso de maduración liberan nuevamente las zoosporas al medio (Longcore et al. 1999).

El origen del hongo sigue siendo poco claro, se presentan dos hipótesis: la primera refleja el hecho de que Bd es un patógeno simbiote que coexistía con especies de ranas *Xenopus* spp. de

África y que pudo ser movilizado a través del comercio internacional de *Xenopus laevis*, utilizada anteriormente para realizar pruebas de embarazo en humanos (Rachowicz et al. 2005; Rosenblum et al. 2013; Vredenburg et al. 2013). La segunda teoría es que Bd es una especie endémica y el cambio en patogenicidad pudo ser el resultado de alteraciones ambientales (Weldon et al. 2004; James et al. 2009). Sin embargo, estudios moleculares más extensivos realizados recientemente, proponen que la historia evolutiva es mucho más compleja de lo que se piensa y que no se trata de una sola cepa que se dispersó por el mundo, sino que en realidad existen diferentes cepas, unas más antiguas que otras (Rosenblum et al. 2013). Por lo que posiblemente infectaba anfibios mucho antes de lo que se reporta (Rosenblum et al. 2013). Además se ha planteado el hecho de que produjo una recombinación genómica a partir de dos linajes independientes, lo cual dio origen a Bd GPL una cepa muy virulenta, que produjo la pandemia que hoy conocemos (James et al. 2009; Farrer et al. 2011; Velo et al. 2012).

### ***Distribución de Bd***

En un contexto espacial se puede resumir que el hongo Bd ha sido encontrado en todos los continentes en donde están los anfibios (Olson et al. 2013) y los declives más dramáticos han sido reportados en Australia, América Central y Norte América (Berger et al. 1998; Olson et al. 2013, Lips et al. 2006) (Figura 2). Altitudinalmente, el hongo también ha demostrado un amplio rango de tolerancia al reportarse desde los 5 metros de elevación en la Isla de Gorgona en el pacífico colombiano (Flechas et al. 2012) hasta los 5400 m en los Andes peruanos (Seimon et al. 2007).



**Figura 2.** Mapa que ilustra los reportes de anfibios infectados por Bd. Relaciona la presencia de Bd con el número de muestras encontradas positivas en cada país. Tomado de <http://www.bd-maps.net>.

En Colombia, se han realizado investigaciones mediante el uso de técnicas histológicas (Ruíz y Rueda 2008; Velásquez et al. 2008) y moleculares (Bahamón 2011; Urbina y Galeano 2011;

Flechas et al. 2012, 2015) que han relacionado a Bd con disminuciones de los géneros *Atelopus*, *Hyloscirtus*, *Eleutherodactylus*, *Colostethus*, *Bolitoglossa*, *Gastrotheca*, *Dendropsophus*, *Pristimantis* y *Leptodactylus*, en los departamentos de Cundinamarca, Boyacá, Santander (Ruíz y Rueda 2008; Velásquez et al. 2008; Bahamón 2011), Antioquia (Urbina y Galeano 2011) y Chocó (Flechas et al. 2015).

### ***Mecanismos de defensa de los anfibios contra Bd***

A la fecha se han descrito cuatro mecanismos de respuesta de tipo inmunológico y comportamental ante la presencia de Bd que pueden explicar el hecho de que haya especies susceptibles y otras tolerantes. En primera instancia se encuentra una respuesta inmunológica no específica que involucra la síntesis de compuestos por las células granulares de la piel con propiedades antimicrobianas incluidas la brevinina, esculentina, palustrina, ranalexina y ranatuerina (Woodhams et al. 2006; Conlon et al. 2013). En segundo lugar se encuentra un tipo de respuesta que se presenta en la segunda fase infecciosa (adaptativa), en la que se produce un incremento de linfocitos T y B (Voyles et al., 2011). Un tercer mecanismo describe un aumento en las tasas de ecdisis como método de eliminación de las zoosporas del hongo (Padgett et al. 2011). Finalmente se considera una respuesta comportamental cuando los anfibios buscan exponerse a zonas más calientes para aumentar la temperatura corporal (fiebre comportamental) y limitar el crecimiento del patógeno (Woodhams et al. 2008; Voyles et al. 2010; Rowley et al. 2013).

### ***Tratamientos para combatir la quitridiomycosis***

Aún no existe un tratamiento contra la quitridiomycosis que sea eficaz en condiciones naturales. Existen varias alternativas que incluyen baños con antifúngico como el itraconazol al 0,01%, que ha sido ampliamente utilizado en distintas especies incluyendo algunas en peligro crítico (Woodhams et al. 2012). Este tratamiento aparentemente es seguro y efectivo, sin embargo existen algunos reportes de toxicidad en renacuajos (Jones et al. 2012; Pessier 2012). También se ha probado con otros antifúngicos como el voriconazol, el cloranfenicol y la terbinafina, sin embargo no han resultado 100% eficaces para erradicar el hongo, además pueden producir efectos secundarios en los individuos afectados (Mofty 2000; Bishop et al. 2009; Martel et al. 2011; Muijsers et al. 2012; Young 2012).



Debido a que el hongo produce un desbalance en la osmorregulación, se realizan tratamientos que contribuyan a la recuperación de la función osmoregulatoria (Voyles et al. 2009; Kilpatrick et al. 2010; Campbell et al. 2012; Baitchman y Pessier 2013). Estos incluyen baños con soluciones de concentración isotónica o ligeramente hipertónica como es el caso de la solución de Ringer (Young et al. 2012; Brannelly et al. 2015). Este tratamiento generalmente se maneja en paralelo con otro tratamiento de eliminación en donde también se usan soluciones de administración oral o inyectable como la de Whitaker-Wright 12% (Brannelly et al. 2015). Los baños con soluciones de cloruro de sodio solo reducen el crecimiento y la motilidad de Bd (Young et al. 2012).

### ***Probióticos como alternativa para el tratamiento de la quitridiomycosis***

Se ha sugerido que las bacterias simbióticas presentes en la piel de los anfibios representan un mecanismo de defensa contra Bd (Harris et al. 2009a; Harris et al. 2009b). Se sabe que existen especies tolerantes que a pesar de estar infectadas no presentan síntomas y otras susceptibles que presentan la sintomatología típica de la enfermedad (Padgett et al. 2011). Esta resistencia/tolerancia puede explicarse por la presencia de bacterias con propiedades antifúngicas (Woodhams et al. 2007; Flechas et al. 2012; Beaker et al. 2015). Bacterias de los géneros *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Brevundimonas*, *Chryseobacterium*, *Citrobacter*, *Curtobacterium*, *Deinococcus*, *Elizabethkingia*, *Enterobacter*, *Microbacterium*, *Novosphingobium*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, aisladas de la piel de individuos de diferentes especies de anfibios alrededor del mundo han exhibido capacidad inhibitoria contra Bd (Flechas et al. 2012; Becker et al. 2015b; Holden et al. 2015; Woodhams et al. 2015).

Otros estudios indican que *Janthinobacterium lividum*, una bacteria epidérmica productora de violaceína (un metabolito antifúngico), impidió la morbilidad causada por el patógeno en *Rana muscosa* (Harris et al. 2009a). También se presentan reportes de que *Pseudomonas reactans*, una bacteria aislada de salamandras de espalda roja (*Plethodon cinereus*) asintomáticas, se estableció en la piel de otros individuos de la misma especie que fueron infectados experimentalmente con Bd (Harris et al. 2009b). La presencia de estas bacterias disminuyó la morbilidad y efectos colaterales de la quitridiomycosis (Harris et al. 2009b). Por otro lado, Becker y colaboradores (2015a) experimentaron con una población de *Atelopus zeteki* utilizando probióticos y Bd, observando que la sobrevivencia de los infectados dependía de la composición de la comunidad bacteriana epidérmica.

Aunque hay estudios que reportan que algunas bacterias simbiotes con actividad anti-Bd, pueden presentar un amplio rango de hospederos (Lauer et al. 2007; Woodhams et al. 2007), el tratamiento con probióticos epidérmicos no siempre ha mostrado los mejores resultados (Becker et al. 2011). Por ejemplo, *J. lividum* tan eficiente en *R. muscosa* no resultó ser un buen probiótico al ser usado en *A. zeteki* de Panamá. En este caso se presentó una mortalidad del 100%, mostrando que la efectividad de las comunidades bacterianas puede variar según las especies que se quieran tratar (Becker et al. 2011).

## **OBJETIVOS**

### ***Objetivo General***

Determinar la actividad anti-*Batrachochytrium dendrobatidis* de la microbiota cultivable presente en la epidermis de dos especies de ranas andinas: *Dendrosophus labialis* (Hylidae) y *Rheobates palmatus* (Aromobatidae).

### ***Objetivos específicos***

1. Aislar e identificar la microbiota bacteriana presente en la epidermis de *Dendrosophus labialis* y *Rheobates palmatus* del municipio de Cáqueza, Cundinamarca (Colombia).
2. Determinar la actividad anti-*Batrachochytrium dendrobatidis* de cada una de las bacterias aisladas mediante ensayos de antagonismo.
3. Determinar las diferencias de la microbiota y su actividad anti-*Batrachochytrium dendrobatidis* entre estadios de desarrollo y especies de anuros.

## **MÉTODOS**

### ***Área de estudio y captura de los anuros***

El muestreo se realizó en la laguna Las Brisas ubicada en el municipio de Cáqueza en el Departamento de Cundinamarca (04° 26' 12" N, 73° 55' 10" W, a 1950 msnm) a 56 km al este de

Bogotá. Los individuos fueron capturados manualmente o con el uso de una red. En total se tomaron muestras de 24 individuos, contando con al menos un representante de cada uno de los estadios (renacuajo, juvenil y adulto) de ambas especies (*Dendropsophus labialis* y *Rheobates palmatus*). Los individuos fueron mantenidos individualmente en bolsas plásticas hasta la toma de la muestra. Cada individuo fue manipulado con guantes nuevos, con el fin de evitar contaminación cruzada. Para cada individuo se registró la longitud rostro-cloacal y el peso. Todos los individuos fueron liberados al finalizar la toma de la muestra.

Previo a la toma de la muestra, todos los animales se lavaron con 50 mL de agua estéril con el fin de remover elementos acompañantes y microorganismos transitorios que no pertenecen a la microbiota propia del animal (Lauer et al, 2007). Para aislar los microorganismos epidérmicos, se realizaron pases durante 30 segundos con hisopos estériles (MWE 113) por toda la superficie de los individuos, según el protocolo descrito por Kueneman et al. (2013). Los hisopos se conservaron en crioviales con 1 mL de solución DS (una solución de sales débiles que simula agua de la charca). Las muestras se mantuvieron en refrigeración hasta ser procesadas en el laboratorio (no más de 48 horas).

#### ***Aislamiento e identificación de la microbiota bacteriana de la piel***

Para el procesamiento de las muestras, se realizaron diluciones seriadas hasta  $10^{-5}$  en solución DS. Con el fin de recuperar la mayor cantidad posible de morfotipos cada dilución fue sembrada en dos medios de cultivo: Agar R2A y agar avena suplementado con nistatina 0.1% para la recuperación de actinobacterias (Franco, 2008). Las placas de Petri se incubaron durante 48 horas a 23°C (Flechas et al. 2012). Posterior al periodo de incubación, se realizó una selección de los morfotipos microbianos teniendo en cuenta caracteres macroscópicos de las colonias, que en el caso de las bacterias fueron el color, elevación, forma y margen. Para las actinobacterias se determinaron parámetros como color de la colonia, la forma, el margen y los pigmentos difusibles al medio.

Los microorganismos encontrados fueron aislados sucesivamente hasta obtener cultivos puros que se criopreservaron a -80°C en glicerol al 30% para su posterior identificación. Debido a que el criterio de selección de las colonias según sus características macroscópicas pueden generar un alto número de aislamientos repetidos entre los individuos o incluso entre las diluciones, se requería discriminar de forma efectiva las especies presentes y reducir la redundancia en el

aislamiento. Para esto, la identificación de las cepas se realizó utilizando espectrofotometría de masas mediante la técnica de desorción/ionización láser asistida por matriz del inglés *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight* (MALDI-TOF-MS). Para esto se reactivaron las cepas en agar nutritivo y fueron incubadas por 24 horas a 30°C.

Partiendo de un cultivo puro, cada cepa fue extendida por duplicado sobre los pozos en una placa de análisis, con ayuda de un palillo. Posteriormente se adicionó la matrix que consiste en una solución saturada de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico, 50% acetonitrilo y 2,5% ácido trifluoroacético. La lectura de las muestras se realizó en el equipo Microflex LT y se visualizó utilizando el software de análisis FlexControl (versión 3.0 Bruker Daltonics) y MALDI Biotyper RTC. Para la calibración de la lectura y como control positivo se utilizó una prueba estándar de un perfil proteico conocido de *Escherichia coli* DH5 (BTS). El espectro de identificación se produjo a partir de 240 disparos de láser por duplicado y la comparación de estos con la biblioteca de espectros de masas del equipo (Bruker) que contiene 4110 espectros, obteniendo puntajes de similitud. Este puntaje fue tenido en cuenta para la selección de la identidad de las bacterias estudiadas de la siguiente manera: un puntaje  $>2,0$  indica identificación a nivel de especie, puntaje entre 1,7-1,9 indica identificación confiable sólo a nivel de género, mientras que valores  $<1,7$  no permiten identificación.

#### ***Identificación de morfotipos no identificados con MALDI-TOF***

Las cepas que no pudieron ser identificadas usando la biblioteca del MALDI (puntaje menor a 1,7) o que presentaban discordancias entre réplicas fueron identificadas mediante la secuenciación del gen 16S rRNA. Para la extracción de ADN se tomó la muestra a partir de una colonia de un cultivo puro con un palillo estéril y fue suspendido en 10  $\mu$ L de agua libre de DNAsas e incubado a 90°C durante 7 minutos, posteriormente se centrifugó a 8000 rpm por 1 minuto. Se tomaron 5  $\mu$ L del sobrenadante y se diluyeron en 5  $\mu$ L de agua libre de DNAsas. Se realizó la amplificación de una región del gen 16S de aproximadamente 1500 pb (Tabla 1), usando los primers universales 27F (5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5'- GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Lane 1991). La mezcla se realizó en un volumen final de 25  $\mu$ L. 0,5  $\mu$ L de cada primer (1 $\mu$ M), 10  $\mu$ L de agua, 12  $\mu$ L de la Tag Green Master Mix lista para usar y 2  $\mu$ L de ADN. Los parámetros del termociclador fueron: una desnaturalización inicial de 3 min a 95°C, seguido por 35 ciclos de 45 segundos a 95°C, 45 segundos a 52°C y 90 s a 72°C.

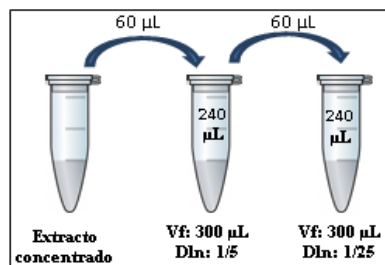
Por último una extensión final para completar la polimerización durante 7 min a 72°C. Los resultados de la PCR se comprobaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%.

Los productos de PCR fueron enviados a secuenciar en MACROGEN, cada muestra con su respectiva secuenciación de los primers forward y reverse, con el fin de obtener una secuencia consenso las cuales fueron ensambladas y limpiadas utilizando el software Sequencher 5.1 para finalmente ser comparadas en la base de datos SILVA con el parámetro SILVA predeterminado por la misma base de datos que compara con las especies cultivables. Las identificaciones se hicieron teniendo en cuenta el E-value y el score arrojado.

### ***Determinación de la actividad anti-Bd mediante pruebas de antagonismo***

Luego de la identificación de las especies de bacterias, se clasificaron según su presencia en cada especie y por estadio, de tal manera que una misma especie podía ser probada más de una vez dependiendo de si se encontraba en dos o en los tres estadios y en una o ambas especies. En total se realizaron 162 ensayos.

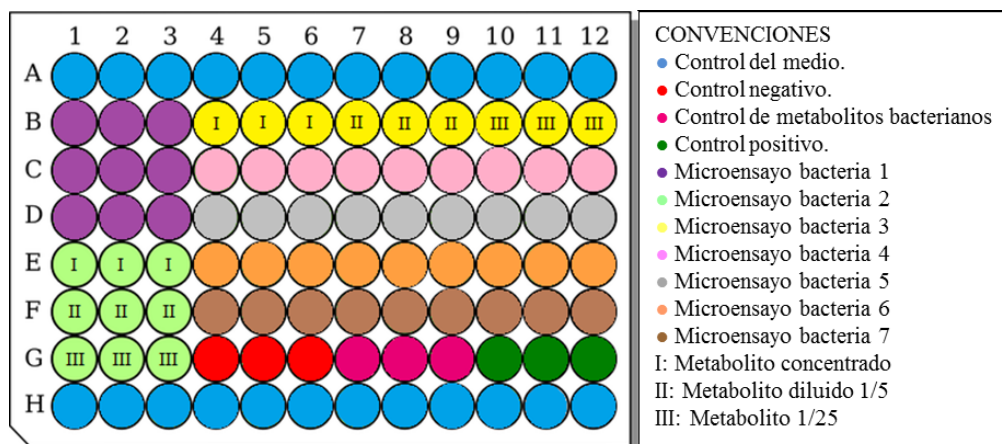
Las bacterias se incubaron en caldo TGhL diluido a la mitad – TGhL 0.5X (5 g de triptona, 2 g de hidrolizado de gelatina y 1 g de lactosa en 1 L de agua) en shaker a 250 rpm, 25°C por un período de 48 horas. Posteriormente, para la obtención de los extractos se agregaron aproximadamente 20-30 perlas de 0.5 mm de diámetro y fueron pasadas por vórtex durante 3 minutos, esto con el fin de causar la lisis mecánica de las células y poder recuperar los metabolitos intracelulares y los liberados al medio. Las muestras fueron centrifugadas a 6000 rpm durante 5 minutos a una temperatura de 4°C, se recuperó el sobrenadante y se pasó por un filtro de cápsula de 0.22 µm. El filtrado de cada bacteria, fue dispuesto en tubos Eppendorf de 1.5 mL para finalmente realizar diluciones seriadas de este extracto, la primera 1/5 y la segunda 1/25 (Figura 3).



**Figura 3.** Esquema de las diluciones realizadas a partir del extracto obtenido del filtrado.

Para los ensayos de antagonismo se utilizó la cepa de Bd EV001 (Flechas et al. 2013), aislada de *Rheobates palmatus* colectada en la misma localidad donde se desarrolló este estudio. La cepa Bd EV001 fue reactivada previamente en agar TGhL 0.5X. Para los ensayos, se observaban las cajas al microscopio de luz en aumento de 10X, en donde se confirmaba que el hongo se encontrara en un estado reproductivo activo (esporulado). Las cajas con mayor actividad eran raspadas y el hongo era resuspendido en el mismo medio (TGhL 0.5X), para luego ser filtrado usando papel Whatman que permite el paso de las zoosporas y retiene los zoosporangios. De esta manera se obtuvo una suspensión concentrada de zoosporas, que posteriormente se contaba en cámara de Neubauer para verificar que el hongo estuviera a una concentración de  $10^6$  zoosporas/mL.

El montaje se realizó por triplicado en placas de Elisa añadiendo 50  $\mu$ L de suspensión de zoosporas a una concentración de  $1 \times 10^6$  zoosporas/mL, 50  $\mu$ L del extracto bacteriano en las diferentes concentraciones mencionadas hasta completar un volumen final de 100  $\mu$ L en cada pozo. Se tuvieron en cuenta cuatro controles: el control positivo consistía en 50  $\mu$ L del hongo vivo + 50  $\mu$ L de medio TGhL 0.5X; el control negativo consistía de 50  $\mu$ L de zoosporas muertas (90 °C durante 15 minutos) + 50  $\mu$ L del medio TGhL 0.5X y el último control que tenía únicamente 100  $\mu$ L del medio TGhL  $\frac{1}{2}$  en los pozos A: 1-12 y H: 1-12 de la placa considerando el efecto de borde (Figura 4). Las placas fueron leídas a las 0, 24, 48 y 72 horas y a los 7 días de realizado el montaje. La lectura se efectuó en lector de microplacas BIO-RAD 680 a una longitud de onda de 490 nm.



**Figura 4:** Esquema de la disposición de los microensayos en las placas de Elisa, representada con colores según los componentes. En donde: control del medio=TGhL 0,5X (100 $\mu$ L), control negativo=50 $\mu$ L de zoosporas muertas + 50 $\mu$ L de TGhL 0,5X, control de metabolitos bacterianos=100  $\mu$ L del metabolito concentrado, control positivo=50  $\mu$ L de zoosporas + 50  $\mu$ L de TGhL 0,5X y los microensayos=50  $\mu$ L de

metabolito bacteriano + 50  $\mu$ L de zoosporas vivas en una concentración de  $10^6$  zoosporas/mL. Cada color representa el metabolito de una bacteria diferente. Los números romanos indican las diferentes diluciones.

### ***Prueba de antagonismo por enfrentamiento directo***

Debido a algunos inconvenientes que se tuvieron con la realización de microensayos en placas de Elisa, se realizó el montaje de 40 bacterias por enfrentamiento directo. Para esto se preparó un cultivo del hongo en 50 mL de caldo TGhL 0.5X, a partir del cual se tomó 1 mL y se dispuso en placas de Petri que contenían 25 mL de medio sólido TGhL 0.5X. Con movimientos circulares se extendió la suspensión sobre la superficie del agar, de manera que el hongo creciera uniformemente en la placa. Se dejó secar a temperatura ambiente en cámara de flujo laminar y posteriormente se sembró una colonia bacteriana aislada de cultivo puro con ayuda de un palillo estéril, trazando una línea horizontal sobre la superficie de la caja. La lectura se realizó 7 días después del montaje, observando la presencia de halos de inhibición del hongo alrededor de la colonia bacteriana.

### ***Análisis de datos***

Se calcularon índices de diversidad de Shannon y Simpson con sus respectivos intervalos de confianza (95%) mediante la técnica del Bootstrap para establecer si existen diferencias en la diversidad de las comunidades bacterianas presentes en los estadios de ambas especies, usando el software PAST para Windows versión 3.10.

Para determinar si los datos tenían una distribución normal, se utilizó el software SPSS versión 18.0, y se realizó la prueba de Shapiro-Wilk en donde no se obtuvieron valores de  $p$  mayores a 0,05 en todos los casos. Por lo que se procedió a utilizar estadística no paramétrica al realizar la prueba de Kruskal-Wallis que establece diferencias significativas entre las variables cuando el valor de  $p$  es menor a 0,05. Esto se realizó con el fin de determinar si existían diferencias significativas entre las especies bacterianas que inhibieron para las especies de anuros y sus respectivos estadios. Para la realización de las gráficas se utilizó la hoja de cálculo de Microsoft Excel 2013 para Windows.

## RESULTADOS

### *Registro de los individuos capturados*

En total se capturaron 24 individuos de ambas especies. Para *Rheobates palmatus* se hicieron frotis de 5 adultos, 5 juveniles y 5 renacuajos. Para *Dendropsophus labialis* se realizaron frotis de 5 adultos, 1 juvenil y 3 renacuajos. De todos los individuos, exceptuando los renacuajos se registró la longitud rostro-cloacal y el peso (Tabla 1).

**Tabla 1.** Descripción de los individuos que fueron muestreados

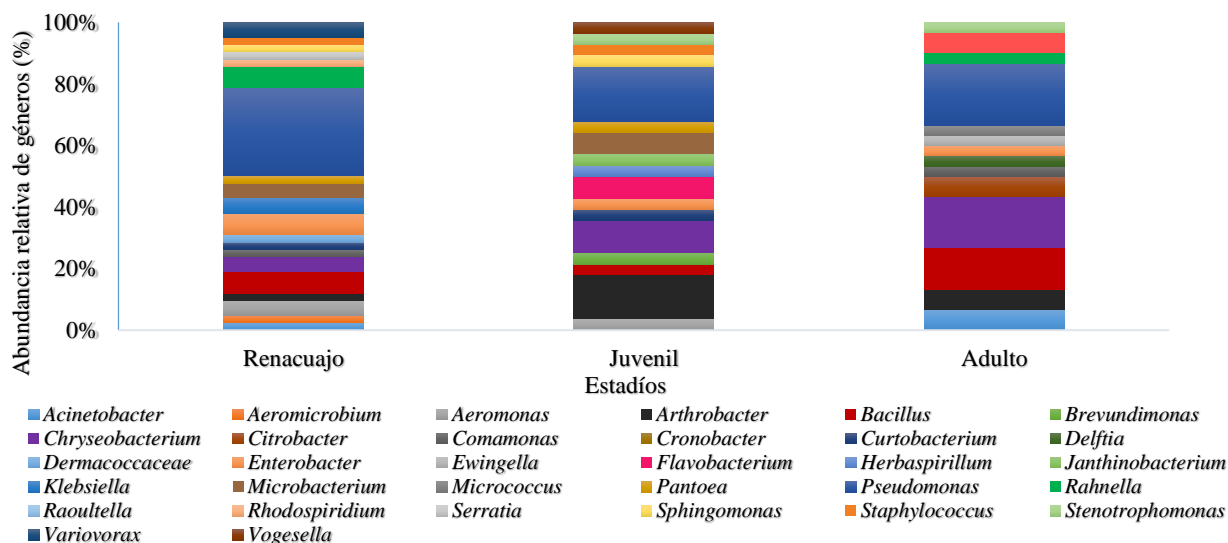
Especie	Estadio	Número de individuos	Longitud rostro-cloacal ( $\bar{x}$ , cm)	SD (mm)	Peso ( $\bar{x}$ , g)	SD (g)
<i>R. palmatus</i>	Adulto	5	3,17	0,75	3,22	0,09
	Juvenil	5	0,77	0,23	2,01	0,26
	Renacuajo	5	N.A	N.A	N.A	N.A
<i>D. labialis</i>	Adulto	5	1,67	0,24	2,51	0,24
	Juvenil	1	0,62	N.A	2.0	N.A
	Renacuajo	3	N.A	N.A	N.A	N.A
<b>Total individuos</b>		<b>24</b>				

### *Aislamiento e identificación de la microbiota bacteriana de la piel*

En total se aislaron 615 morfotipos de bacterias, 468 a partir de medio R2A y 147 de medio avena. Fueron identificadas 93 especies pertenecientes a 35 géneros (Tabla 2). Las especies con mayor prevalencia fueron aquellas pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* (22% de las especies), *Bacillus* (8%), *Arthrobacter* (5%) y *Chryseobacterium* (4%). Mientras que el género cuya única especie encontrada fue *Janthinobacterium lividum*, asociada a un único individuo juvenil de *R. palmatus* (Figura 5 y 6). El listado completo de las bacterias identificadas se encuentra en el anexo 1.

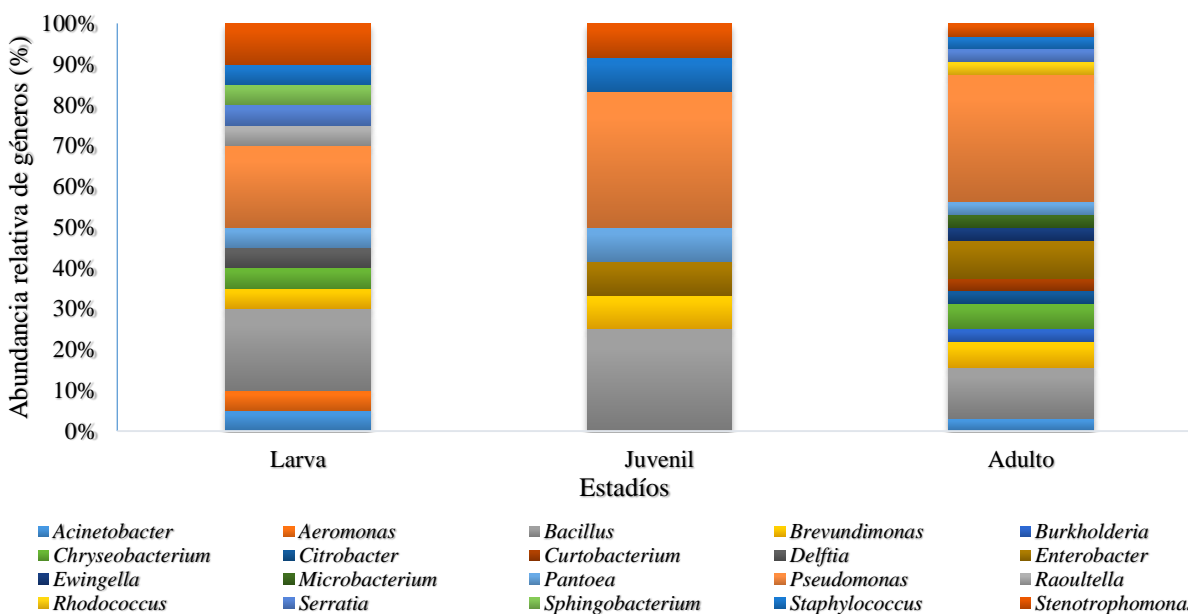


### Especies de bacterias/género (%) presentes en *R. palmatus*



**Figura 5:** Porcentaje de géneros de bacterias encontradas en cada estadio de *R. palmatus*.

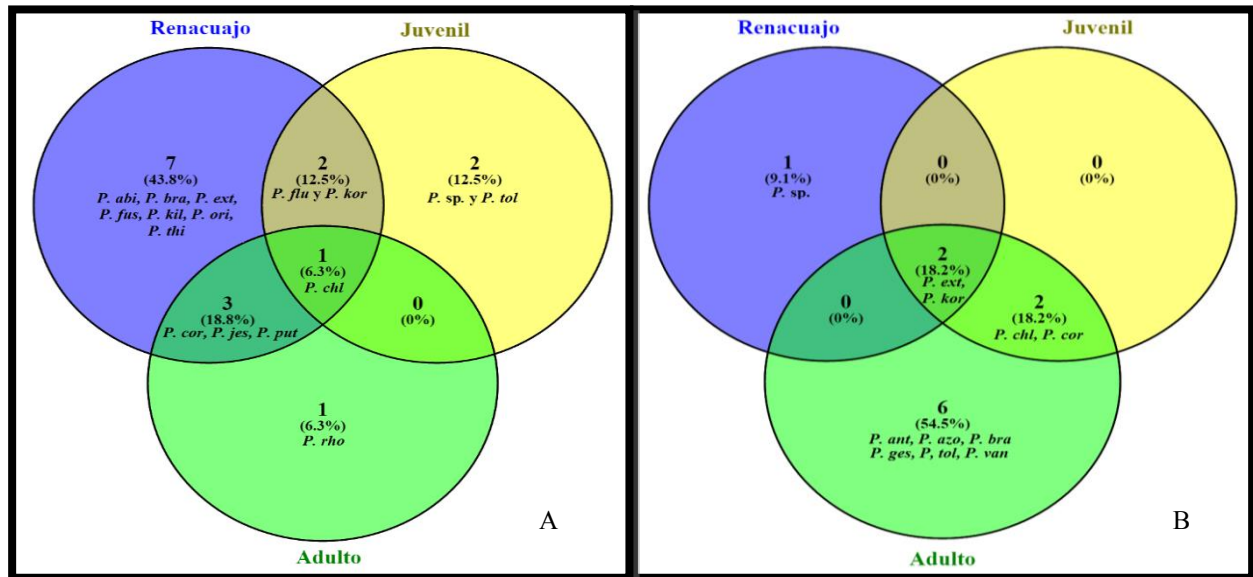
### Especies de bacterias/género (%) presentes en *D. labialis*



**Figura 6:** Porcentaje de géneros de bacterias encontradas en cada estadio de *D. labialis*.

*Pseudomonas* fue el género con mayor número de especies encontradas en todos los estadios de las dos especies de ranas. Particularmente, los renacuajos de *R. palmatus* y los adultos de *D. labialis* fueron los que presentaron un mayor número de especies de *Pseudomonas* independiente

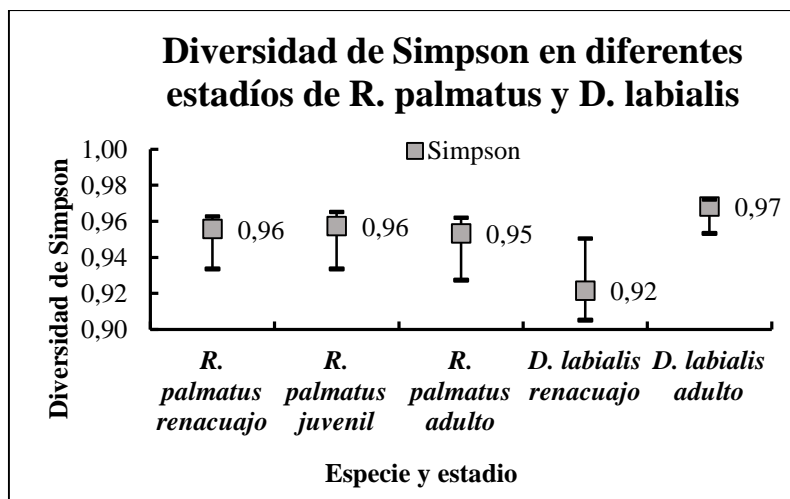
de los otros estadios (Figura 7). Se realizó una comparación de las especies encontradas entre los estadios y se encontró que *P. extremorientalis* se encuentra presente en todos los individuos de *D. labialis*, mientras que *P. koreensis* fue encontrada en todos los estadios de ambas especies de ranas a excepción de la etapa adulta de *R. palmatus* (Figura 7).



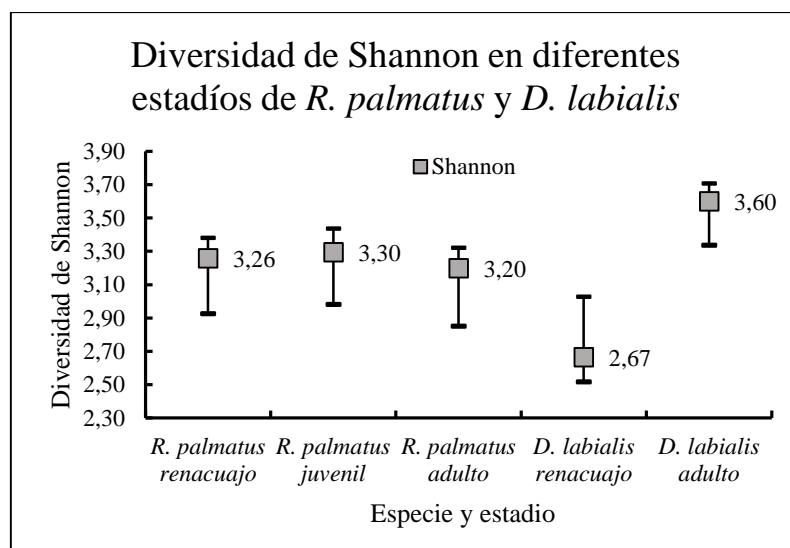
**Figura 7:** Diagramas de Venn que muestran las especies de *Pseudomonas* que comparten los estadios de cada especie (A: *R. palmatus*, B: *D. labialis*). En donde las especies están señaladas por las tres primeras letras que componen su nombre: *P. abietaniphila*=*P. abi*, *P. antártica*=*P. ant*, *P. azotoformans*=*P. azo*, *P. brassicacearum*=*P. bra*, *P. chlororaphis*=*P. chl*, *P. corrugata*=*P. cor*, *P. extremorientalis*=*P. ext*, *P. fluorescens*=*P. flu*, *P. fuscovaginae*=*P. fus*, *P. gessardii*=*P. ges*, *P. jessenii*=*P. jes*, *P. kilonensis*=*P. kil*, *P. koreensis*=*P. kor*, *P. orientalis*=*P. ori*, *P. putida*=*P. put*, *P. rhodesiae*=*P. rho*, *Pseudomonas sp*=*P. sp.*, *P. thivervalensis*=*P. thi*, *P. tolaasii*=*P. tol*, *P. vancouverensis*=*P. van*.

### **Análisis de diversidad**

Se aplicaron índices de diversidad de Shannon y Simpson a las comunidades bacterianas, en los que se observó (para ambos índices) que *D. labialis* en el estadio adulto es la que presenta la mayor diversidad, mientras que la que presentó menor diversidad fue *D. labialis* en estadio renacuajo (Figura 8 y 9). Es posible identificar que *D. labialis* en estadio adulto, presenta diferencias significativas en términos de diversidad microbiana con *D. labialis* en estadio renacuajo y *R. palmatus* en estadio adulto, este último es claro solo según el índice de diversidad de Shannon (Figura 9). El estadio juvenil para *D. labialis* no se tuvo en cuenta para este análisis pues sólo se realizó la captura de un individuo.



**Figura 8:** Diversidad de Simpson para la composición bacteriana de las especies *R. palmatus* y *D. labialis* en los diferentes estadios de desarrollo: renacuajo, juvenil y adulto.



**Figura 9:** Diversidad de Shannon para la composición bacteriana de las especies *R. palmatus* y *D. labialis* en los diferentes estadios de desarrollo: renacuajo, juvenil y adulto.

### ***Bacterias con efecto de inhibición contra Bd***

De los 162 ensayos de antagonismo 84 inhibieron a *Bd* (52%) y 78 no inhibieron (48%). Este resultado se determinó a partir de los valores de absorbancia obtenidos como una medida de crecimiento del hongo. Comparando las absorbancias de control positivo versus las obtenidas en pozos en los que se expuso *Bd* con los diferentes metabolitos bacterianos. Se encontró que 56 especies de las 93 que fueron identificadas, presentaron efecto inhibitorio (52%) dentro de las cuales están: *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Chryseobacterium joostei*,

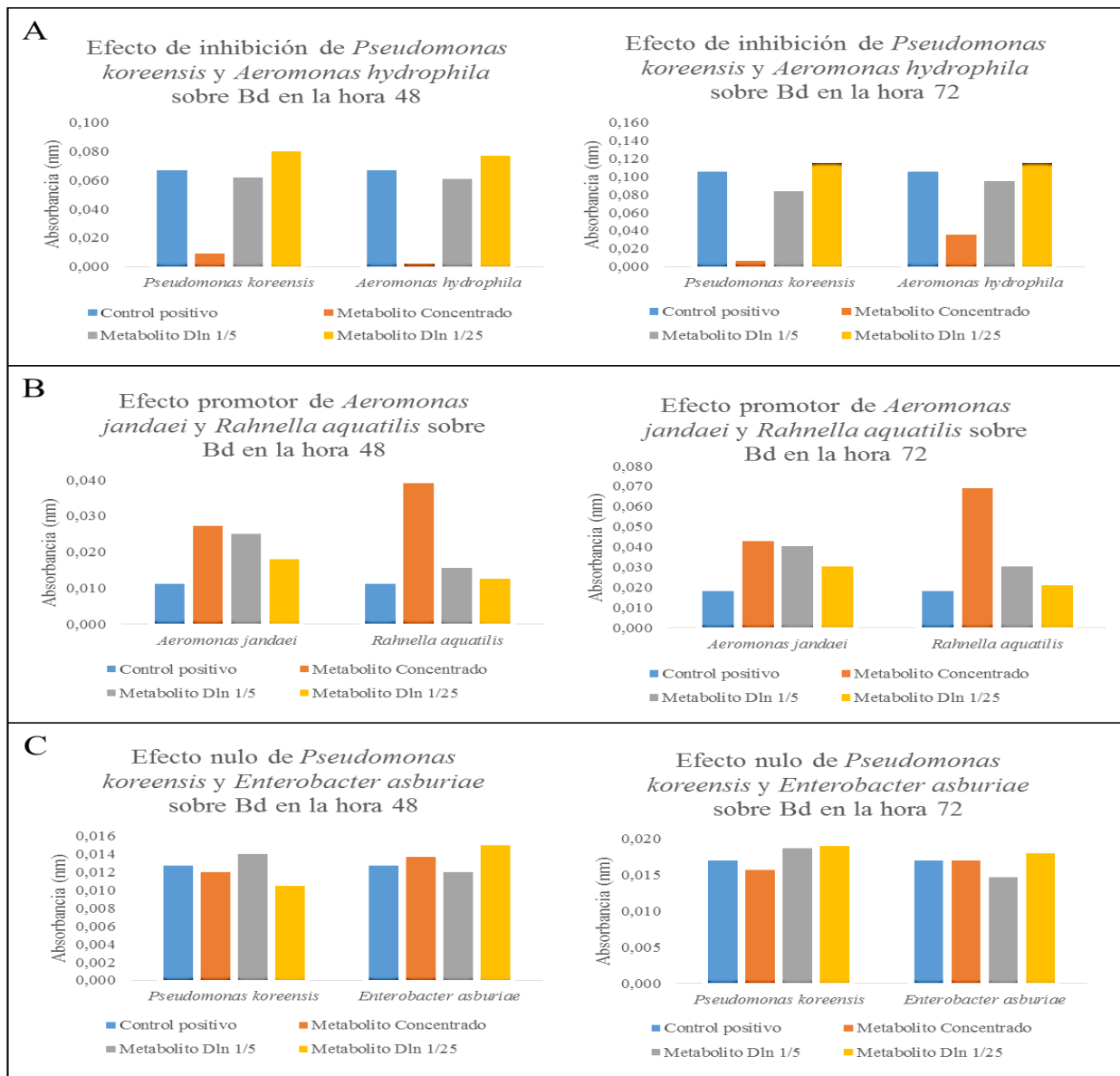
*Janthinobacterium lividum*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Raoultella terrigena* entre otras (Tabla 2).

**Tabla 2.** Especies de bacterias que presentaron inhibición en uno o más estadios de las especies *R. palmatus* y *D. labialis*.

Especie de bacteria	<i>R. palmatus</i>			<i>D. labialis</i>		
	Adulto	Juvenil	Renacuajo	Adulto	Juvenil	Renacuajo
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>			X			
<i>Acinetobacter johnsonii</i>						X
<i>Acinetobacter junii</i>	X					
<i>Aeromonas hydrophila</i>		X	X			X
<i>Arthrobacter gandavensis</i>		X				
<i>Arthrobacter oxydans</i>	X	X				
<i>Bacillus cereus</i>	X		X		X	
<i>Bacillus circulans</i>				X	X	
<i>Bacillus megaterium</i>	X		X			
<i>Bacillus sonorensis</i>	X					
<i>Bacillus sp.</i>						X
<i>Bacillus subtilis</i>	X		X			
<i>Brevundimonas sp.</i>				X		
<i>Brevundimonas vesicularis</i>					X	X
<i>Chryseobacterium hagamense</i>				X		
<i>Chryseobacterium joostei</i>	X	X	X			
<i>Chryseobacterium sp.</i>	X			X		
<i>Citrobacter freundii</i>	X					
<i>Citrobacter koseri</i>			X			
<i>Comamonas sp.</i>			X			
<i>Curtobacterium luteum</i>		X				
<i>Delftia acidovorans</i>						X
<i>Enterobacter amnigenus</i>	X				X	
<i>Enterobacter asburiae</i>			X			
<i>Enterobacter cloacae</i>				X		
<i>Enterobacter cowanii</i>			X			
<i>Herbaspirillum huttiense</i>		X				
<i>Janthinobacterium lividum</i>		X				
<i>Microbacterium resistens</i>			X			
<i>Pantoea agglomerans</i>			X			X
<i>Pseudomonas antarctica</i>				X		
<i>Pseudomonas azotoformans</i>				X		

<i>Pseudomonas brassicacearum</i>			X			
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	X		X			
<i>Pseudomonas corrugata</i>	X		X	X	X	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		X	X			
<i>Pseudomonas jessenii</i>	X					
<i>Pseudomonas kilonensis</i>			X			
<i>Pseudomonas koreensis</i>		X	X			
<i>Pseudomonas putida</i>	X		X			
<i>Pseudomonas sp.</i>		X				X
<i>Rahnella aquatilis</i>	X					
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	X		X			X
<i>Raoultella terrigena</i>	X		X			
<i>Rhodococcus erythropolis</i>				X		
<i>Serratia fonticola</i>			X			
<i>Serratia sp.</i>				X		X
<i>Sphingomonas aerolata</i>			X			
<i>Sphingomonas trueperi</i>		X				
<i>Staphylococcus epidermidis</i>				X		
<i>Staphylococcus sciuri</i>					X	X
<i>Stenotrophomonas ehizophila</i>		X				
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>					X	
<i>Stenotrophomonas sp.</i>			X			X
<i>Variovorax sp.</i>			X			
<i>Vogesella sp.</i>		X				
<b>Total especies por estadio</b>	<b>17</b>	<b>13</b>	<b>25</b>	<b>11</b>	<b>7</b>	<b>11</b>

En términos generales los microensayos en placas de Elisa, sugieren dos efectos diferentes de los metabolitos bacterianos sobre Bd. El primero fue el de inhibición parcial del crecimiento, cuando la absorbancia registrada en los pozos de Bd + metabolito es menor a la absorbancia del control positivo (Figura 10A). En segundo lugar, se evidenció un efecto promotor del crecimiento del hongo, obteniéndose una absorbancia mayor con respecto al control positivo (Figura 10B). Finalmente se presentó un tercer escenario en el que las absorbancias registradas en los ensayos eran muy similares al control positivo (Figura 10C), considerándose que los metabolitos bacterianos no causaron ningún efecto en el hongo. Para los dos primeros casos fue posible observar un efecto diferencial en las concentraciones usadas, siendo mayor en cualquier caso cuando el metabolito se encontraba más concentrado.



**Figura 10:** Ejemplos de cada uno de los escenarios que se presentaron en las pruebas de antagonismo en placas Elisa, en las horas 48 y 72 para cada caso, donde A ejemplifica el efecto de inhibición sobre Bd, B el efecto de promotor de crecimiento de Bd y C, la ausencia de efecto en Bd.

En cuanto a las bacterias que se probaron por enfrentamiento directo, se consideró como efecto de inhibición cuando se presentaba un halo de inhibición de crecimiento del hongo alrededor de la colonia bacteriana (Figura 11).



**Figura 11:** Fotografía de las pruebas de enfrentamiento directo donde **A** corresponde a *Serratia* sp., que produjo halo de inhibición frente a Bd. **B** corresponde a *Staphylococcus sciuri* que no produjo halo de inhibición.

#### ***Diferencias entre las bacterias que inhiben Bd***

La prueba de Kruskal-Wallis, indicó que existen diferencias significativas entre las especies bacterianas que inhiben en *R. palmatus* en estadio de renacuajo con respecto a *R. palmatus* en estadio juvenil ( $p < 0.05$ ). De igual manera todos los estadios de *D. labialis* presentaron diferencias con respecto a los de *R. palmatus* (con valores de  $p$  de 0,0048 para el estadio adulto, 0,0002 para el estadio juvenil y 0,0048 para el estadio renacuajo).

## **DISCUSIÓN**

Las relaciones entre las comunidades microbianas y sus hospederos pueden ser muy complejas y están moduladas por factores como la genética del hospedero, la historia de vida, comportamiento, condiciones del ecosistema y la ontogenia (Ding y Schloss 2014). En este estudio se encontró de manera predominante géneros como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Chryseobacterium*, y *Arthrobacter*, los cuales han sido reportados en otros estudios realizados en diferentes especies de salamandras y ranas (Lauer et al. 2008; Mckenzie et al. 2012; Belden et al. 2015; Woodhams 2015). Además se encontraron con menos frecuencia especies de los géneros *Acinetobacter*, *Stenoptophomonas*, *Janthinobacterium*, *Enterobacter*, *Comamonas* y *Flavobacterium*, que han sido descritos en otras especies de anuros como simbioses epidérmicos comunes (Woodhams et al. 2015).

Se encontraron diferencias entre los estadios adulto y renacuajo de *D. labialis*, este resultado concuerda con investigaciones previas, en las que se reporta que la composición de las comunidades microbianas difiere entre estadios de desarrollo (Kueneman et al. 2013). Esto puede deberse a las diferencias ambientales que enfrentan, pues los renacuajos se desarrollan en cuerpos de agua con componentes microbianos diferentes que pueden incidir en la presencia de determinadas especies bacterianas (McKenzie et al. 2012). Además se deben considerar los cambios estructurales e inmunológicos que se producen en la piel de los anfibios durante la metamorfosis (Rollins-Smith 1998, Faszewski et al. 2008), ya que estos pueden ser un factor que explica las diferencias en la composición microbiana entre estos estadios (Kueneman et al. 2013; Longo et al. 2015).

Por otra parte, se presentaron diferencias significativas en la diversidad de Shannon entre el estadio adulto de *D. labialis* y adulto de *R. palmatus*, este mismo resultado no se observa claramente en el índice de Simpson. Puede ser debido a que Shannon está asociado a la probabilidad de que un individuo con determinada identidad específica sea seleccionado aleatoriamente en una comunidad (Jost 2006; Chao et al. 2013), por lo que le otorga mayor valor a una especie extraña o poco abundante, mientras que el índice de Simpson se ve más afectado por las especies más dominantes (Ramírez-González 2005). Es decir, la estructura de la comunidad microbiana en ambas especies difiere significativamente.

Estas diferencias en las composiciones bacterianas entre especies concuerdan con investigaciones en las que se utilizó tecnología molecular avanzada mediante pirosecuenciación con código de barras del gen 16S rRNA para establecer la totalidad del microbioma bacteriano en varias comunidades de anfibios (McKenzie et al 2012), al igual que estudios de microbiota cultivable en donde se observa una gran variabilidad entre las especies encontradas en cuatro especies de anfibios (Walke et al. 2015). Además, la piel de los anuros puede variar por la presencia de péptidos antimicrobianos, secreciones mucosas y los niveles de desprendimiento de la piel, los cuales pueden afectar el establecimiento y mantenimiento de las comunidades microbianas residentes (Meyer et al. 2012; Walke et al. 2014).

Por el contrario, se encontró que no se presentan diferencias significativas en los índices de diversidad entre ningún estadio de la especie *R. palmatus*. Sin embargo, especies de *Chryseobacterium* y *Citrobacter* fueron identificadas únicamente en individuos adultos de *R.*



*palmatus*. Aunque no se conocen con claridad los mecanismos de adquisición de comunidades únicas de la piel, existen dos posibles escenarios que explican las diferencias en la diversidad entre estadios: el primero incluye la transmisión vertical (de padres a hijos), puesto que ha sido comprobado que los padres pueden transmitir microbiota simbiote en la rana cristal (*Hyalinobatrachium colymbiphyllum*) (Walke et al. 2011). El segundo escenario considera la exposición a una variedad de fuentes ambientales (agua, sedimentos, algas, invertebrados, materia orgánica), propician la adquisición de ciertos microorganismos (Lauer et al. 2008; Loudon et al, 2013; Walke et al. 2014). Este último mecanismo en *R. palmatus* es determinante, ya que la especie, al menos en la localidad de estudio es frecuentemente encontrada dentro del agua a lo largo de su ciclo de vida, lo que podría contribuir a que se mantenga cierta similitud entre la microbiota presente entre los diferentes estadios (Cortés 2014). Sin embargo, este último es discutible pues en estudios anteriores, las comunidades bacterianas encontradas en las especies no suelen coincidir con las encontradas en el ambiente en el que se desarrollan (McKenzie et al. 2012).

En el sitio donde se desarrolló este estudio el hongo ha sido detectado en las dos especies de anuros desde hace por lo menos siete años y se sabe que la prevalencia de la infección es para estas especies de anuros cercana al 40% (comunicación personal). De los 24 individuos usados para este estudio, fueron detectados tres infectados con el hongo, un juvenil de *R. palmatus* y dos adultos de *D. labialis*. Dado que las especies de anfibios llevan bastante tiempo conviviendo con el patógeno, se puede explicar que haya un gran número de bacterias que presentaron actividad anti-Bd (52% de las especies identificadas), pues se ha demostrado que la las tasas de supervivencia frente el hongo pueden depender de la composición de la microbiota epidérmica (Becker et al. 2015a). Además la prevalencia de estas bacterias favorables se considera un mecanismo coevolutivo en respuesta a la presencia constante del hongo, como ha sido reportado en poblaciones de la especie de rana de patas amarillas (*Rana muscosa*), en donde las poblaciones de ranas que han convivido por más tiempo con el patógeno, tienen mayor proporción de bacterias con actividad anti-Bd (Woodhams et al. 2007; Lam et al., 2010).

Dentro de las especies bacterianas que presentan esta capacidad de inhibición, se encuentran con mayor frecuencia las especies del género *Pseudomonas* y *Bacillus*, que han demostrado con anterioridad ser géneros predominantes con actividad anti-Bd en la microbiota de ranas

(Woodhams et al. 2007; Flechas et al. 2012) y salamandras (Lauer et al. 2008). También se encontró a *Janthinobacterium lividum*, que ha sido considerado como el caso único caso efectivo de bioaugmentación para el tratamiento de la enfermedad (Harris et al. 2009a). Sin embargo, para esta investigación estuvo asociada a un único individuo de estadio juvenil de *R. palmatus* y dentro de los 615 morfotipos obtenidos solo se recuperó una vez y en las pruebas de antagonismo no se destacó por presentar un alto y duradero efecto de inhibición. Por lo que la cepa recuperada en este caso no necesariamente sería la mejor estrategia de tratamiento probiótico.

Los modelos de acción inhibidora suceden muy probablemente a través de la producción de antibióticos, pero otros componentes tales como bacteriocinas (péptidos producidos por bacterias), productos de la degradación bacteriana de nutrientes como ácidos orgánicos, lisozimas y proteasas también pueden aumentar el efecto observado (Alabama. 2000); sin embargo este efecto en muchos casos fue disminuyendo con el tiempo observándose con claridad a las 48 horas, pero no a las 72, por lo que se asocia con que se tenía un metabolito finito o que no se encontraba en la concentración necesaria para inhibir la totalidad de los propágulos del hongo y al agotarse permitió el crecimiento del hongo. En contraste la promoción del crecimiento de *Bd* puede ocurrir cuando los metabolitos bacterianos sirven como nutrientes o a través de efectos hormesis, donde las concentraciones muy bajas de antibióticos promueven el crecimiento que es inhibido por concentraciones más altas (Southam y Ehrlich 1943, Stebbing 1982).

Para el caso en el que no se presentó ningún efecto sobre el crecimiento del hongo, no se descarta la posibilidad de que realmente se presente un efecto de inhibición. Probablemente las 48 horas que se dejó crecer cada bacteria no fue suficiente en algunos casos para que se produjera una adecuada cantidad de metabolitos y que se evidenciara un efecto inhibidor. Desafortunadamente para este estudio no se realizó la cuantificación del extracto bacteriano inicial, lo cual deja abierta la posibilidad de que lo que se ha considerado como sin efecto, sea solamente un efecto de la baja cantidad de metabolitos. Es sabido que los antimicrobianos bacterianos tienen un rango de acción que depende de la concentración a la que sea expuesto el hongo. Tal es el caso de la violaceína producida por *J. lividum* que requiere una concentración de 18microM para que exista un efecto letal (Becker et al 2009).

Llama especialmente la atención las diferencias que se presentaron en las comunidades bacterianas. A pesar de que los diferentes estadios de la especie *R. palmatus* presentaron una

composición bacteriana similar y no presentaron diferencias significativas en términos de diversidad, las especies con actividad anti-Bd fueron diferentes para cada uno. Es decir, las especies que cumplen un efecto en la inhibición de Bd, varían en cada estadio; esto implica que en varias ocasiones una misma especie de bacteria no presentó inhibición en todos los estadios en los que fue encontrada. Este resultado concuerda con un estudio realizado en salamandras en el que la diversidad de especies bacterianas epidérmicas era aparentemente baja pero con una alta actividad antifúngica (Lauer et al. 2008).

El estadio juvenil de *R. palmatus* fue el que presentó la mayor cantidad de bacterias con capacidad de inhibición. En lo que se sabe de estas especies, el estadio juvenil es el que mayor prevalencia de infección presenta, y aun así no se ha visto una disminución en su población, por lo que la alta frecuencia de recuperación de bacterias con actividad anti-Bd podrían explicar que esta población persista (Mckenzie et al 2012). Mientras que en el estadio juvenil de *D. labialis* fue la que presentó menor cantidad de bacterias con efecto antagónico, esto puede deberse a que otra manera que usan los anfibios para controlar el patógeno es exponerse al sol para elevar su temperatura corporal provocando una fiebre comportamental que ayuda a controlar la infección por la muerte de las zoosporas por calor (Voyles et al. 2010; Rowley et al. 2013). Este comportamiento es comúnmente reportado para *D. labialis* (Loddecke 1995; Navas 1996) de tal manera que puede tratarse de dos mecanismos que actúen sinérgicamente es esta especie para limitar el crecimiento del patógeno.

De igual manera, el hecho de que ambas especies de anuros presenten bacterias simbiotes similares y su actividad contra el patógeno sea diferente, puede explicarse por el hecho de que se ha demostrado que las comunidades bacterianas co-evolucionan estrechamente con su hospedero según las condiciones bajo las cuales se encuentre y pueden diferenciarse en subespecies o cepas diferentes con el tiempo (Steinert et al, 2000).

En conclusión, este estudio permitió realizar una descripción de la microbiota cultivable presente en la piel de ranas que cohabitan con Bd, estableciendo que los géneros más abundantes fueron *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Chryseobacterium*, y *Arthrobacter* para ambas especies. No se presentaron diferencias en la diversidad entre los estadios de *R. palmatus* pero si entre los evaluados de *D. labialis*. Del total de bacterias encontradas en la piel de las ranas, aproximadamente el 52% presentaron actividad antifúngica. Pese a que la composición de la

microbiota bacteriana no fue significativamente diferente entre ambas especies de anuros y sus estadios, las especies que tienen un efecto de inhibición sobre Bd, si varían en cada estadio, encontrándose para este estudio, que los juveniles de *R. palmatus* presentaron la mayor cantidad de bacterias con actividad anti-Bd.

## **RECOMENDACIONES**

Se sugieren más estudios que permitan determinar los mecanismos de adaptación y establecimiento de la microbiota epidérmica si se piensa en un tratamiento con microorganismos para combatir la quitridiomycosis.

Se sugiere continuar en el proceso de estandarización de los microensayos en placas de Elisa, incluyendo mayor cantidad de controles positivos y agregando un control positivo para la inhibición en el que se exponga a Bd con los metabolitos bacterianos de una bacteria que haya presentado un efecto de inhibición comprobado.

Se recomienda para próximas investigaciones tener en cuenta la cuantificación de las extracciones con el fin de establecer una concentración mínima inhibitoria contra el patógeno.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Alford RA, & Richards SJ (1999). Global amphibian declines: A problem in applied ecology. *Annual Review of Ecology and Systematics* 30:133–165.

AmphibiaWeb: Information on amphibian biology and conservation. [web application] 2015 Berkeley, California: AmphibiaWeb. Available: <http://amphibiaweb.org/> (Accessed: August 22, 2015).

Bahamón JP (2011). Detección de *Batrachochytrium dendrobatidis* en anfibios de un bosque húmedo tropical submontano localizado en el municipio de Santa María-Boyacá. Tesis de pregrado. Universidad Javeriana.

Baitchman EJ & Pessier AP (2013) Pathogenesis, diagnosis, and treatment of amphibian chytridiomycosis. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 16(3), 669-685. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.cvex.2013.05.009>

Beard KH, Vogt KA & Kulmatiski A (2002) Top-down effects of a terrestrial frog on forest nutrient dynamics. *Oecologia*, 133(4), 583-593.

Becker MH, Brucker RM, Schwantes CR, Harris RN, y Minbiole KP. (2009). The bacterially produced metabolite violacein is associated with survival of amphibians infected with a lethal fungus. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(21), 6635-6638. doi:10.1128/AEM.01294-09.

Becker MH & Harris RN (2010) Cutaneous bacteria of the redback salamander prevent morbidity associated with a lethal disease. *PLoS ONE*, 5(6), e10957.

Becker MH, Harris RN, Minbiole KP, Schwantes CR, Rollins-Smith LA, Reinert LK et al (2011). Towards a better understanding of the use of probiotics for preventing chytridiomycosis in Panamanian golden frogs. *EcoHealth*, 8(4), 501-506.

Becker CG, Rodriguez D, Longo AV, Toledo LF, Lambertini C, Leite DS, et al. (2015) Deforestation, host community structure, and amphibian disease risk. *Basic and Applied Ecology*, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.baae.2015.08.004>.

Becker MH, Walke JB, Cikanek S, Savage AE, Mattheus N, Santiago CN, et al (2015b) Composition of symbiotic bacteria predicts survival in panamanian golden frogs infected with a lethal fungus. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 282(1805), 20142881.

Beebee TJ y Griffiths RA (2005) The amphibian decline crisis: A watershed for conservation biology? *Biological Conservation*, 125(3), 271-285. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.biocon.2005.04.009>

Belden LK & Harris RN (2007) Infectious diseases in wildlife: the community ecology context. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 5(10), 533-539.

Berger L, Speare R, Daszak P, Green DE, Cunningham AA, Goggin CL, et al (1998) Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(15), 9031-9036.

Berger L, Speare R, Hyatt AD. (1999) Chytrid fungi and amphibian declines: overview, implications and future directions. In: Campbell A. *Declines and disappearances of Australian frogs*. Environment Australia: Canberra. 23-33.

Berger L, Speare R, Marantelli G & Skerratt LF (2009) A zoospore inhibition technique to evaluate the activity of antifungal compounds against *Batrachochytrium dendrobatidis* and unsuccessful treatment of experimentally infected green tree frogs (*Litoria caerulea*) by fluconazole and benzalkonium chloride. *Research in Veterinary Science*, 87(1), 106-110. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2008.11.005>

Berger L, Speare R, Pessier A, Voyles J, Skerratt LF. 2010 Treatment of chytridiomycosis requires urgent clinical trials. *Dis Aquat Org* 2010;92(2):165.

Bletz MC, Rosa GM, Andreone F, Courtois EA, Schmeller DS, Rabibisoa NH, Weldon C. (2015) Widespread presence of the pathogenic fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in wild amphibian communities in Madagascar. *Scientific Reports*, 5 (8633).

Bosch J, Martínez-Solano I, García-Paris M. (2001) Evidence of a chytrid fungus infection involved in the decline of the common midwife toad (*Alytes obstetricans*) in protected areas of central Spain. *Biology Conservation* 2001;97(3):331-337.

Bowerman J, Rombough C, Weinstock SR, Padgett-Flohr GE. (2010) Terbinafine hydrochloride in ethanol effectively clears *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibians. *Journal of Herpetological Medicine and Surgery* 2010;20(1):24-28.

Boyle D, Boyle D, Olsen V, Morgan J & Hyatt A (2004) Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time taqman PCR assay. *Diseases of Aquatic Organisms*, 60, 141-148.

Brannelly LA, Skerratt LF, Berger L. (2015) Treatment trial of clinically ill corroboree frogs with chytridiomycosis with two triazole antifungals and electrolyte therapy. *39(3):179-187*.

Campbell CR, Voyles J, Cook DI & Dinudom A (2012) Frog skin epithelium: Electrolyte transport and chytridiomycosis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 44(3), 431-434. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2011.12.002>

Carey C & Alexander MA (2003) Climate change and amphibian declines. *Diversity and Distributions*, 9(2), 111-121.

Chanson J, Hoffman M, Cox N. & Stuart S (2008) The State of the World's Amphibians. En: Stuart SN, Hoffman M, Chanson JS, Cox NA, Berridge RJ, Ramani P et al. (2008). *Threatened Amphibians of the World*. Ediciones Lynx, Barcelona, España. IUCN, Gland, Suiza; y Conservación Internacional, Arlington, Virginia, USA.

Chao A, Wang Y & Jost L (2013) Entropy and the species accumulation curve: a novel entropy estimator via discovery rates of new species. *Methods in Ecology and Evolution*. 4: 1091-1100.

Clay K (2014). Defensive symbiosis: A microbial perspective. *Functional Ecology*, 28(2), 293-298. doi:[10.1111/1365-2435.12258](https://doi.org/10.1111/1365-2435.12258)

Collins JP & Storfer A (2003) Global amphibian declines: sorting the hypotheses. *Diversity and distributions*, 9(2), 89-98.

Conlon JM, Reinert LK, Mechkarska M, Prajeep M, Meetani MA, Coquet L, et al (2013) Evaluation of the skin peptide defenses of the Oregon spotted frog *Rana pretiosa* against infection by the chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Journal of Chemical Ecology*, 39(6), 797-805.

Cortés JE (2014) Microhabitat use of *Rheobates palmatus* (werner 1899) (Anura: Aromobatidae) in a riverside ecosystem of Villa de Leyva, Colombia. *Herpetotropicos*, 10(1-2)

Cortéz-Gómez AM, Ruiz-Agudelo CA, Valencia-Aguilar A & Ladle RJ (2015) Ecological functions of Neotropical amphibians and reptiles: a review. *Universitas Scientiarum*, 20(2), 229-245.

Crawshaw G, Pienkowski M, Lentini A, Dutton C, Delnatte P, Russell D et al. (2014) Brown skin disease: A syndrome of dysecdysis in puerto rican crested toads (*Peltophryne lemur*). *Zoo Biology*, 33(6), 558-564.

Creed RP, Taylor A & Pflaum JR (2010) Bioturbation by a dominant detritivore in a headwater stream: litter excavation and effects on community structure. *Oikos*, 119(12), 1870-1876.

Croel RC, Kneitel JM (2011) Ecosystem-level effects of bioturbation by the tadpole shrimp *Lepidurus packardii* in temporary pond mesocosms. *Hydrobiologia*, 665(1):169-181.

Cushman SA (2006) Effects of habitat loss and fragmentation on amphibians: A review and prospectus. *Biological Conservation*, 128 (2), 231- 240. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.biocon.2005.09.031>

D'Amen M & Bombi P (2009) Global warming and biodiversity: Evidence of climate-linked amphibian declines in Italy. *Biological Conservation*, 142(12), 3060-3067. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.biocon.2009.08.004>

Davidson C, Bradley Shaffer H & Jennings MR (2001) Declines of the California red-legged frog: climate, UV-B, habitat, and pesticides hypotheses. *Ecological Applications*, 11(2), 464-479.

Davidson C, Shaffer HB & Jennings MR (2002) Spatial tests of the pesticide drift, habitat destruction, UV-B, and climate-change hypotheses for California amphibian declines. *Conservation Biology*, 16(6), 1588-1601.

Daszak PA, Strieby AA, Cunningham JE, Longcore CC, Brown & Porter D (2004) Experimental evidence that the bullfrog (*Rana catesbeiana*) is a potential carrier of chytridiomycosis, an emerging fungal disease of amphibians. *Herpetological Journal*, 14:201–207.

Ding T, Schloss PD (2014). Dynamics and associations of microbial community types across the human body, *Nature*, 509: 357-360.

Edwards DP, Tobias JA, Sheil D, Meijaard E, Laurance WF (2014) Maintaining ecosystem function and services in logged tropical forests. *Trends in Ecology & Evolution*, 29(9), 511-520. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.tree.2014.07.003>



Faszewski EE, Tyrell A, Guin S, Kaltenbach JC (2008) Metamorphic changes in localization of sugars in skin of the leopard frog, *Rana pipiens*. *Journal of Morphology*, 269(8), 998-1007.

Fites JS, Ramsey JP, Holden WM, Collier SP, Sutherland DM, Reinert LK, et al (2013) The invasive chytrid fungus of amphibians paralyzes lymphocyte responses. *Science*, 342(6156), 366-369. doi:<http://dx.doi.org/10.1126/science.1243316>

Flechas SV, Sarmiento C, Cárdenas ME, Medina EM, Restrepo S & Amézquita A (2012) Surviving chytridiomycosis: Differential anti-*Batrachochytrium dendrobatidis* activity in bacterial isolates from three lowland species of *Atelopus*. *PLoS ONE*, 7(9): e44832.

Flechas SV, Vredenburg VT, Amézquita A (2015) Infection prevalence in three lowland species of harlequin toads from the threatened genus *Atelopus*. *Herpetological Review*. 46(4), 528–532.

Flechas SV, Medina E, Crawford A, Sarmiento C, Cárdenas M, Amézquita A, Restrepo S (2013) Characterization of the first *Batrachochytrium dendrobatidis* isolate from the Colombian Andes, an amphibian biodiversity hotspot. *EcoHealth*. 10(1):72-6.

Flórez LV, Biedermann PH, Engl T, Kaltenpoth M (2015) Defensive symbioses of animals with prokaryotic and eukaryotic microorganisms. *Natural Product Reports*. 32 (904-936).

Fox JW, Serrano SM. Approaching the golden age of natural product pharmaceuticals from venom libraries: an overview of toxins and toxin-derivatives currently involved in therapeutic or diagnostic applications. *Current Pharmaceutical Design* 2007;13(28):2927-2934.

Franco-Correa M (2008) Evaluación de caracteres PGPR en actinomicetos e interacciones de estas rizobacterias con hongos formadores de micorriza. Tesis Doctoral. Doctorado en Biología Agraria. Director: Dr. José Miguel Barea Navarro. Facultad de Ciencias, Universidad de Granada. 266 pp.

Garner T, Garcia G, Carroll B, Fisher M. Using itraconazole to clear *Batrachochytrium dendrobatidis* infection, and subsequent depigmentation of *Alytes muletensis* tadpoles. *Disease of Aquatic Organisms*, 2009;83:257-260.

Georoff TA, Moore RP, Rodriguez C, Pessier AP, Newton AL, McAloose D & Calle PP (2013) Efficacy of treatment and long-term follow-up of *Batrachochytrium dendrobatidis* PCR-positive

anurans following itraconazole bath treatment. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 44(2), 395-403.

Gerber GK. (2014). The dynamic microbiome. *FEBS Letters*, 588(22), 4131-4139. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2014.02.037>

Ghirardi R. Estudio de quitridiomycosis por *Batrachochytrium dendrobatidis* en anfibios anuros del Litoral. Tesis de doctorado. Cuyo y Patagonia Argentina 2012.

Gibbons JW, Winne CT, Scott DE, Willson JD, Glaudas X, Andrews KM, et al (2006) Remarkable amphibian biomass and abundance in an isolated wetland: implications for wetland conservation. *Conservation Biology*, 20(5), 1457-1465.

Gray MJ, Miller DL, Hoverman JT. (2009) Ecology and pathology of amphibian ranaviruses. *Diseases of Aquatic Organisms*, 87(3):243-266.

Green DM (2003) The ecology of extinction: Population fluctuation and decline in amphibians. *Biological Conservation*, 111(3), 331-343. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3207\(02\)00302-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3207(02)00302-6).

Groff JM, Mughannam A, McDowell TS, Wong A, Dykstra MJ, Frye FL, y Hedrick RP (1991). An epizootic of cutaneous zygomycosis in cultured dwarf African clawed frogs (*Hymenochirus curtipes*) due to *Basidiobolus ranarum*. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 29(4), 215-223.

Groner ML, Rollins-Smith LA, Reinert LK, Hempel J, Bier ME, y Relyea RA (2014). Interactive effects of competition and predator cues on immune responses of leopard frogs at metamorphosis. *The Journal of Experimental Biology*, 217(3), 351-358.

Hacquard S, Garrido-Oter R, González A, Spaepen S, Ackermann G, Lebeis S et al (2015). Microbiota and host nutrition across plant and animal kingdoms. *Cell Host & Microbe*, 17(5), 603-616. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2015.04.009>

Hamann M, González C (2009) Larval digenetic trematodes in tadpoles of six amphibian species from Northeastern Argentina. *Journal of Parasitology*, 95(3):623-628.

Hamer AJ & McDonnell MJ (2008) Amphibian ecology and conservation in the urbanising world: A review. *Biological Conservation*, 141(10), 2432-2449. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.biocon.2008.07.020>

Harris RN, Brucker RM, Walke JB, Becker MH, Schwantes CR, Flaherty DC, et al (2009a) Skin microbes on frogs prevent morbidity and mortality caused by a lethal skin fungus. *The ISME Journal*, 3(7), 818-824.

Harris RN, Lauer A, Simon MA, Banning JL & Alford RA (2009b) Addition of antifungal skin bacteria to salamanders ameliorates the effects of chytridiomycosis. *Diseases of Aquatic Organisms*, 83(1), 11.

Hayes TB, Falso P, Gallipeau S & Stice M (2010) The cause of global amphibian declines: A developmental endocrinologist's perspective. *The Journal of Experimental Biology*, 213(6), 921-933. doi:10.1242/jeb.040865

Hocking DJ y Babbitt KJ (2014) Amphibian contributions to ecosystem services. *Herpetological Conservation and Biology*, 9(1), 1-17.

Hodgson WC, Isbister GK (2009) The application of toxins and venoms to cardiovascular drug discovery. *Current opinion in pharmacology*, 9(2):173-176.

Holden WM, Hanlon SM, Woodhams DC, Chappell TM, Wells HL, Glisson SM, et al (2015) Skin bacteria provide early protection for newly metamorphosed southern leopard frogs (*Rana sphenoccephala*) against the frog-killing fungus, *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Biological Conservation*, 187(0), 91-102. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.biocon.2015.04.007>

Hyatt A, Boyle D, Olsen V, Boyle D, Berger L, Obendorf D, et al (2007) Diagnostic assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 73, 175-192.

Jackson K (2014) Herpetology: An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles. *Phyllomedusa: Journal of Herpetology*, 12(2), 147-149.

James TY, Litvintseva AP, Vilgalys R, Morgan JA, Taylor JW, Fisher MC, et al. (2009) Rapid global expansion of the fungal disease chytridiomycosis into declining and healthy amphibian populations. *PLoS Pathog*, 5(5), e1000458.

Jancovich JK, Davidson EW, Seiler A, Jacobs BL & Collins JP (2001) Transmission of the *Ambystoma tigrinum* virus to alternative hosts. *Diseases of Aquatic Organisms*, 46(3), 159-163.

Jiang Y, Xi X, Ge L, Yang N, Hou X, Ma J, et al. Bradykinin-related peptides (BRPs) from skin secretions of three genera of phyllomedusine leaf frogs and their comparative pharmacological effects on mammalian smooth muscles. *Peptides* 2014 2;52:122-133.

Johnson PT, Lunde KB, Ritchie EG, Reaser JK, Launer AE. Morphological abnormality patterns in a California amphibian community. *Herpetologica* 2001:336-352.

Jones ME, Paddock D, Bender L, Allen JL, Schrenzel MD & Pessier AP (2012) Treatment of chytridiomycosis with reduced-dose itraconazole. *Diseases of Aquatic Organisms*, 99(3), 243-249. doi:10.3354/dao02475.

Jost L (2006) Entropy and Diversity. *Oikos*. 113(2):363-375.

Kueneman JG, Parfrey LW, Woodhams DC, Archer HM, Knight R, McKenzie VJ (2014) The amphibian skin-associated microbiome across species, space and life history stages. *Molecular Ecology*, 23(6), 1238-1250.

Kiesecker, J. M., Blaustein, A. R., & Belden, L. K. (2001). Complex causes of amphibian population declines. *Nature*, 410(6829), 681-684.

Kilpatrick AM, Briggs CJ & Daszak P (2010) The ecology and impact of chytridiomycosis: An emerging disease of amphibians. *Trends in Ecology & Evolution*, 25(2), 109-118. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.tree.2009.07.011

King GF (2011) Venoms as a platform for human drugs: translating toxins into therapeutics. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 11(11):1469-1484.

Küng D, Bigler L, Davis LR, Gratwicke B, Griffith E & Woodhams DC (2014) Stability of microbiota facilitated by host immune regulation: informing probiotic strategies to manage amphibian disease. *PLoS ONE*, 9(1): e87101

Lam BA, Walke JB, Vredenburg VT, Harris RN (2010) Proportion of individuals with anti-*Batrachochytrium dendrobatidis* skin bacteria is associated with population persistence in the frog *Rana muscosa*. *Biological Conservation*, 143(2), 529-531. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.biocon.2009.11.015>

Larsen EH (2011) Reconciling the Krogh and Ussing interpretations of epithelial chloride transport? Presenting a novel hypothesis for the physiological significance of the passive cellular chloride uptake. *Acta Physiologica*, 202(3), 435-464. doi:10.1111/j.1748-1716.2010.02239.x

Latney LV, Klaphake E (2013) Selected Emerging Diseases of Amphibia. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 5;16(2):283-301.

Lauer A, Simon MA, Banning JL, André E, Duncan K & Harris R (2007) Common cutaneous bacteria from the eastern red-backed salamander can inhibit pathogenic fungi. *Copeia*, (3), 630-640.

Lauer A, Simon MA, Banning JL, Lam BA, Harris RN (2008) Diversity of cutaneous bacteria with antifungal activity isolated from female four-toed salamanders. *The ISME Journal* 2 (2): 145-157.

Laurance WF (1996) Catastrophic declines of Australian rainforest frogs: Is unusual weather responsible? *Biological Conservation*, 77(2-3), 203-212. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0006-3207\(95\)00142-5](http://dx.doi.org/10.1016/0006-3207(95)00142-5)

Lips KR, Brem F, Brenes R, Reeve JD, Alford RA, Voyles J, et al. (2006). Emerging infectious disease and the loss of biodiversity in a Neotropical amphibian community. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 28;103(9):3165-3170.

Loddecke H (1995) Intra- and interpopulational comparison of temperatures selected by *Hyla labialis* (Anura). *Scienlia Herpetologica*. 192-196.

Loeffler J, Henke N, Hebart H, Schmidt D, Hagemeyer L, Schumacher U & Einsele H (2000) Quantification of fungal DNA by using fluorescence resonance energy transfer and the light cycler system. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(2), 586-590.

Longcore JE, Pessier AP & Nichols DK (1999) *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia*, 91(2), 219-227.

Longo AV, Savage AE, Hewson I, Zamudio KR (2015) Seasonal and ontogenetic variation of skin microbial communities and relationships to natural disease dynamics in declining amphibians. *Royal Society Open Science*, 2(7), 140377.

Loudon AH, Woodhams DC, Parfrey LW, Archer H, Knight R, McKenzie V, Harris RN (2014) Microbial community dynamics and effect of environmental microbial reservoirs on red-backed salamanders (*Plethodon cinereus*). *The ISME Journal*, 8(4), 830-840.

McKenzie VJ, Bowers RM, Fierer N, Knight R, Lauber CL (2012) Co-habiting amphibian species harbor unique skin bacterial communities in wild populations. *The ISME Journal*, 6(3), 588-596.

Martel A, Fard MS, Van Rooij P, Jooris R, Boone F, Haesebrouck F, et al (2012) Road-killed common toads (*Bufo bufo*) in Flanders (Belgium) reveal low prevalence of ranaviruses and *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Journal of Wildlife Diseases*, 48(3):835-839.

Martel A, Spitzen-van der Sluijs A, Blooi M, Bert W, Ducatelle R, Fisher MC. et al (2013) *Batrachochytrium salamandrivorans* sp. nov. causes lethal chytridiomycosis in amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(38), 15325-15329.

Mendoza C, Burrowes P, & Parra G (2015) La quitridiomicosis en los anfibios de México: Una revisión. *Revista Mexicana De Biodiversidad*, 86(1), 238-248. doi:<http://dx.doi.org/10.7550/rmb.42588>

Merck E (1990) Manual de medios de cultivo. Merck-Igoda, División Diagnóstico. Barcelona, España. 356 pp.

Meyer EA, Cramp RL, Bernal MH, Franklin CE (2012) Changes in cutaneous microbial abundance with sloughing: possible implications for infection and disease in amphibians. *Diseases of Aquatic Organisms* 101: 235-242.

Muijsers M, Martel A, Van Rooij P, Baert K, Vercauteren G, Ducatelle R, et al (2012) Antibacterial therapeutics for the treatment of chytrid infection in amphibians: Columbus's egg? *BMC Veterinary Research*, 25;8:175-6148-8-175.

Muths E, Corn PS, Pessier AP & Earl Green, D (2003) Evidence for disease-related amphibian decline in colorado. *Biological Conservation*, 110(3), 357-365. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3207\(02\)00239-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3207(02)00239-2)

Mutschmann F (2015) Chytridiomycosis in amphibians. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 24(3), 276-282.

Nori J & Loyola R (2015) On the worrying fate of data deficient amphibians. *PLoS ONE*, 10(5), n/a. doi:<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0125055>

Nyström P, Hansson J, Månsson J, Sundstedt M, Reslow C, & Broström A (2007) A documented amphibian decline over 40 years: Possible causes and implications for species recovery. *Biological Conservation*, 138(3–4), 399-411. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.biocon.2007.05.007>

Ochoa-Ochoa LM, Rodríguez P, Mora F, Flores-Villela O & Whittaker RJ (2012) Climate change and amphibian diversity patterns in Mexico. *Biological Conservation*, 150(1), 94-102. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.biocon.2012.03.010>

Olson DH, Aanensen DM, Ronnenberg KL, Powell CI, Walker SF, Bielby J, et al (2013) Mapping the global emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis*, the amphibian chytrid fungus. *PloS One*, 8(2), e56802.

Padgett-Flohr GE & Hayes, M. P (2011) Assessment of the vulnerability of the Oregon spotted frog (*Rana pretiosa*) to the amphibian chytrid fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*). *Herpetological Conservation and Biology*, 6(2), 99-106.

Pasmans F, Blahak S, Martel A, Pantchev N, Zwart P (2008) Ranavirus-associated mass mortality in imported red tailed knobby newts (*Tylototriton kweichowensis*): A case report. *Vet J* 176(2):257-259.

Passaglia SA, dos Santos MB, Mendes LV, Vaz PL, dos Santos CP, Zanini CS, et al (2015) Identification of influential events concerning the Antarctic ozone hole over southern Brazil and the biological effects induced by UVB and UVA radiation in an endemic treefrog species. *Ecotoxicology Environmental Safety* 8;118:190-198.

Pasteris SE, Guidoli MG, Otero MC, Bühler MI, Nader-Macías ME. In vitro inhibition of *Citrobacter freundii*, a red-leg syndrome associated pathogen in raniculture, by indigenous *Lactococcus lactis* CRL 1584. *Veterinary Microbiology* 2011 8/5;151(3–4):336-344.

Pearman PB, & Garner TW (2005) Susceptibility of Italian agile frog populations to an emerging strain of Ranavirus parallels population genetic diversity. *Ecology Letters*, 8(4), 401-408.

Peltzer PM, Lajmanovich RC, Sanchez LC, Attademo AM, Junges CM, Bionda CL, et al. Morphological abnormalities in amphibian populations. *Herpetological Conservation and Biology* 2011;6(3):432-442.

Pessier AP (2014). Chapter 21 - Infectious Diseases of Amphibians: It Isn't Just Redleg Anymore. In: Divers DRMJ, editor. *Current Therapy in Reptile Medicine and Surgery* St. Louis: W.B. Saunders;. p. 247-254.

Philippe G, Angenot L. Recent developments in the field of arrow and dart poisons. *J Ethnopharmacol* 2005 8/22;100(1–2):85-91.

Pimm SL, Jenkins CN, Abell R, Brooks TM, Gittleman JL, Joppa LN, et al (2014) The biodiversity of species and their rates of extinction, distribution, and protection. *Science*, 344(6187), 1246752.

Poll CP (2009) Wound Management in Amphibians: Etiology and Treatment of Cutaneous Lesions. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 1;18(1):20-35.8

Rachowicz LJ, Hero J, Alford RA, Taylor JW, Morgan J, Vredenburg VT, et al (2005). The Novel and Endemic Pathogen Hypotheses: Competing Explanations for the Origin of Emerging



Infectious Diseases of Wildlife; La Hipótesis del Patógeno Incipiente y Endémico: Explicaciones Opuestas del Origen de Enfermedades Infecciosas Emergentes en la Vida Silvestre. *Conserv Biol* 2005;19(5):1441-1448.

Ramírez-Gonzales A (2005) *Ecología Aplicada: Diseño y Análisis Estadístico*. Fundación Universitaria Jorge Tadeo Lozano, Bogotá, Colombia.

Rohr JR, Schotthoefer AM, Raffel TR, Carrick HJ, Halstead N, Hoverman JT, et al. (2008) Agrochemicals increase trematode infections in a declining amphibian species. *Nature*, 455(7217):1235-1239.

Rollins-Smith LA (1998). Metamorphosis and the amphibian immune system. *Immunological Reviews*, 166(1), 221-230.

Rollins-Smith, LA, Fites JS, Reinert LK, Shiakolas AR, Umile TP, y Minbiole KP (2015). Immunomodulatory metabolites released by the frog-killing fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Infection and Immunity*, 83(12), 4565-4570. doi:10.1128/IAI.00877-15.

Rosenblum EB, James TY, Zamudio KR, Poorten TJ, Ilut D, Rodriguez D, et al. (2013) Complex history of the amphibian-killing chytrid fungus revealed with genome resequencing data. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(23):9385-9390.

Rowley J, Hoang H, Le DT, Dau VQ, Neang T, Cao TT (2013). Low prevalence or apparent absence of *Batrachochytrium dendrobatidis* infection in amphibians from sites in Vietnam and Cambodia. *Herpetological Review*, 44, 466-469.

Ruiz A, Rueda-Almonacid JV. *Batrachochytrium dendrobatidis* and Chytridiomycosis in Anuran Amphibians of Colombia. *EcoHealth* 2008; 5:27- 33.

Salminen SJ, Gueimonde M, & Isolauri, E. (2005). Probiotics that modify disease risk. *The Journal of Nutrition*, 135(5), 1294-1298. doi:135/5/1294

Schloegel LM, Daszak P, Cunningham AA, Speare R, Hill B. Two amphibian diseases, chytridiomycosis and ranaviral disease, are now globally notifiable to the World Organization for Animal Health (OIE): an assessment. *Dis Aquat Org* 2010;92(2-3):101-108.

SiB – Sistema de Información sobre Biodiversidad de Colombia 2014 Biodiversidad en Cifras. Disponible en: [www.sibcolombia.net](http://www.sibcolombia.net). Consultado el 21 de Junio de 2015.

Southam CM, Ehrlich J (1943) Effects of extracts of western red-cedar heartwood on certain wood-decaying fungi in culture. *Phytopathology* 33: 517–524

Stebbing ARD (1982) Hormesis—the stimulation of growth by low levels of inhibitors. *The Science of the Total Environment* 22: 213–234

Steinert M, Hentschel U, Hacker J (2000) Symbiosis and pathogenesis: Evolution of the microbe-host interaction. *Naturwissenschaften*, 87(1), 1-11.

Stuart SN & Edicions L (2008) Threatened amphibians of the world. Lynx Edicions Barcelona, Spain.

Urban MC, Lewis LA, Fučíková, K, & Cordone A (2015). Population of origin and environment interact to determine oomycete infections in spotted salamander populations. *Oikos*, 124(3), 274-284.

Velo G, Rodríguez D, Savage AE, Parra-Olea G, Lips KR., Zamudio KR (2012) Amphibian-killing fungus loses genetic diversity as it spreads across the new world. *Biological Conservation*, 146(1), 213-218.

Verschuere L, Rombaut G, Sorgeloos P, Verstraete W (2000) Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64: 655–671

Vitt LJ & Caldwell, JP (2014) *Herpetology: an Introductory Biology of Amphibians and Reptiles*. Academic Press. New York. 543pp.

Vittoz P, Cherix D, Gonseth Y, Lubini V, Maggini R, Zbinden N, et al (2013) Climate change impacts on biodiversity in switzerland: A review. *Journal for Nature Conservation*, 21(3), 154-162. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jnc.2012.12.002>

Voyles J, Young S, Berger L, Campbell C, Voyles WF, Dinudom A, et al (2009) Pathogenesis of chytridiomycosis, a cause of catastrophic amphibian declines. *Science (New York, N.Y.)*, 326(5952), 582-585. doi:10.1126/science.1176765 [doi]

Voyles J, Richards-Hrdlicka K, Cashins SD, Rosenblum EB, Hyatt AD, Berger L & Skerratt LF (2010) *Batrachochytrium dendrobatidis*: Requirement for further isolate collection and archiving. *Diseases of Aquatic Organisms*, 92(2-3), 109-1120.

Voyles J, Rosenblum EB & Berger, L (2011) Interactions between *Batrachochytrium dendrobatidis* and its amphibian hosts: A review of pathogenesis and immunity. *Microbes and Infection*, 13(1), 25-32. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2010.09.015>

Vredenburg VT, Felt SA, Morgan EC, McNally SV, Wilson S, Green SL. (2013) Prevalence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in *Xenopus* collected in Africa (1871–2000) and in California (2001–2010)

Wake DB, Vredenburg VT (2008) Colloquium paper: Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105:11466-11473. doi:10.1073/pnas.0801921105

Walke JB, Becker MH, Loftus SC, House LL, Cormier G, Jensen RV, Belden K (2014) Amphibian skin may select for rare environmental microbes. *The ISME Journal*, 1-11.

Weldon, C., du Preez, L. H., Hyatt, A. D., Muller, R., & Spears, R. (2004). Origin of the amphibian chytrid fungus. *Emerging Infectious Diseases*, 10(12) doi:10.3201/eid1012.030804 [doi]

Whiles MR, Lips KR, Pringle CM, Kilham SS, Bixby RJ, Brenes R, et al (2006) The effects of amphibian population declines on the structure and function of Neotropical stream ecosystems. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 4(1), 27-34.

Whittaker K, Koo MS, Wake DB & Vredenburg VT (2013) Global declines of amphibians. In S. A. Levin (Ed.), *Encyclopedia of biodiversity* (second edition) (pp. 691-699). Waltham: Academic Press. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384719-5.00266-5>

Woodhams DC & Alford RA (2005) Ecology of chytridiomycosis in rainforest stream frog assemblages of tropical Queensland. *Conservation Biology*, 19(5), 1449-1459.

Woodhams DC, Rollins-Smith LA, Carey C, Reinert L, Tyler MJ & Alford, RA (2006) Population trends associated with skin peptide defenses against chytridiomycosis in Australian frogs. *Oecologia*, 146(4), 531-540.

Woodhams DC, Vredenburg VT, Simon M, Billheimer D, Shakhtour B, Shyr Y, et al (2007) Symbiotic bacteria contribute to innate immune defenses of the threatened mountain yellow-legged frog, *Rana muscosa*. *Biological Conservation*, 138(3–4), 390-398. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.biocon.2007.05.004>

Woodhams DC, Alford RA, Briggs CJ, Johnson M & Rollins-Smith LA (2008) Life-history trade-offs influence disease in changing climates: Strategies of an amphibian pathogen. *Ecology*, 89(6), 1627-1639.

Woodhams DC, Bosch J, Briggs CJ, Cashins S, Davis LR, Lauer A et al (2011) Mitigating amphibian disease: Strategies to maintain wild populations and control chytridiomycosis. *Frontiers in Zoology*, 8(1), 8-9994-8-8. doi:10.1186/1742-9994-8-8

Woodhams DC, Geiger CC, Reinert LK, Rollins-Smith LA, Lam B, Harris RN, et al. (2012) Treatment of amphibians infected with chytrid fungus: learning from failed trials with itraconazole, antimicrobial peptides, bacteria, and heat therapy. *Disease of Aquatic Organisms*; 98(1):11.

Woodhams DC, Brandt H, Baumgartner S, Kielgast J, Küpfer E, Tobler U, et al (2014) Interacting symbionts and immunity in the amphibian skin mucosome predict disease risk and probiotic effectiveness. *PloS ONE*, 9(4): e96375.

Woodhams DC, Alford RA, Antwis RE, Archer H, Becker MH, Belden LK, et al (2015) Antifungal isolates database of amphibian skin-associated bacteria and function against emerging fungal pathogens: Ecological Archives E096-059. *Ecology*, 96(2), 595-595.

Xi X, Li R, Jiang Y, Lin Y, Wu Y, Zhou M, et al. Medusins: A new class of antimicrobial peptides from the skin secretions of phyllomedusine frogs. *Biochimie* 2013 6;95(6):1288-1296.

Zucol F, Ammann RA, Berger C, Aebi C, Altwegg M, Niggli FK, et al (2006) Real-time quantitative broad-range PCR assay for detection of the 16S rRNA gene followed by sequencing for species identification. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(8), 2750-2759.

## ANEXOS

*Listado de secuencias consenso obtenidas mediante la secuenciación del gen 16S.*

ID: 1

*Chryseobacterium*

ACCCAGACTTCCATGGCTTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGCCATGGCTGATGCGCGAT  
TACTAGCGATTCMAGCTTCATAGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGAACTGAGACCGGCTTTCGAGATTCGCATCACA  
TCGCTGTGTAGCTGCCCTCTGTACCGGCCATTGTATTACGTGTGTGGCCCAAGACGTAAGGGCCGTGATGATTTGACGTC  
ATCCCCACCTTCCTCTCTACTTGCGTAGGCAGTCTCACTAGAGTCCTCAACTGAATGTTAGCAACTAGTGACAGGGGTTG  
CGCTCGTTGCAGGACTTAACCTAACACCTCACGGCACGAGCTGACGACAACCATGCAGCACCTTGAAAAATGTCCGAA  
GAAGGATCTATTTCTAAATCTGTCAATTTCCCATTTAAGTCTTGGTAAGGTTCCTCGCGTATCATCGAATTAACCACATA  
ATCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCATTCTTGCGAACGTACTIONCCAGGTGGCTAACTTATCA  
CTTTCGCTTAGTCTCTGAATCCGAAAACCCAAAAACGAGTTAGCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATC  
CTGTTTCGCTCCCCACGCTTTCGTCCATCAGCGTCAGTTAAAACATAGTGACCTGCCTTCGCAATTGGTGTTCTAAGTAAT  
ATCTATGCATTTACCGCTACACTACTTATTCCAGCCACTTCTACTTTACTCAAGACCTGCAGTATCAATGGCAGTTTCAT  
AGTTAAGCTATGAGATTTACCACTGACTTACAGATCCGCCTACGGACCCTTTAAACCCAATAAATCCGGATAACGCTT  
GCACCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGTGCTTATTCGTATAGTACCTTCAGCTACTCTCACGAG  
AGTAGGTTTATCCCTATACAAAAGAAGTTTACAACCCATAGGGCCGTCGTCCCTCACGCGGGATGGCTGGATCAGGCTC  
TCACCCATTGTCCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGTCCGTGTCTCAGTACCAGTGTGGGGGATCACC  
CTCTCAGGCCCCCTAAAGATCACTGACTTGGTAGGCCGTTACCCTACCAACTATCTAATCTTGCGCGTGCCCATCTCTAT  
CCACCGGAGTTTTCAATAATCAATGATGCCATCAATTATATTATGGGGTATTAATCTTCCTTTTCGAAAGGCTATCCCCCT  
GATAAAGGTAGGTTG

ID: 6

*Chryseobacterium*

TCACCGACTTCAGGTACCCAGACTTCCATGGCTTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGCCA  
TGGCTGATGCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCATAGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGAACTGAGACCAGCTTTC  
GAGATTTGCATCACGTCACCGTGTAGCTGCCCTCTGTACTGGCCATTGTATTACGTGTGTGGCCCAAGGCGTAAGGGCC  
GTGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTYTCTACTTGCGTAGGCAGTCTCACTAGAGTCCCCAACTTAATGATGGCAA  
CTAGTGACAGGGGTTGCGCTCGTTGCAGGACTTAACCTAACACCTCACGGCACGAGCTGACGACAACCATGCAGCACCT  
TGAAAAATGTCCGAAGAAAAGTCTATTTCTAAACCTGTCATTTCCCATTTAAGCCTTGGTAAGGTTCCTCGCGTATCATC  
GAATTAACCACATAATCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCATTCTTGCGAACGTACTIONCCAG  
GTGGCTAACTTATCACTTTCGCTTAGTCTCTGAATCCGAAAATCCAAAAACGAGTTAGCATCGTTTACGGCGTGGACTAC  
CAGGGTATCTAATCCTGTTTCGCTCCCCACGCTTTCGTCCATCAGCGTCAGTTGTTGCTTAGTAACCTGCCTTCGCAATTG

GTGTTCTAAGTAATATCTATGCATTTACCGCTACACTACTTATTCCAGCTACTTCAACAACACTCAAGACCTGCAGTAT  
CAATGGCAGTTTCACAGTTAAGCTGTGAGATTTACCACTGACTTACAGATCCGCCTACGGACCCTTTAAACCCAATAA  
ATCCGGATAACGCTTGCACCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGTGCTTATTCGTATAGTACCTTC  
AGCTACCCTCACGAGAGTAGGTTTATCCCTATACAAAAGAAGTTTACAACCCATAGGGCAGTCGTCCTTCACGCGGGAT  
GGCTGGATCAGGCTCGCACCCATTGTCCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGTCCGTGTCTCAGTACCA  
GTGTGGGGGATCACCCCTCTCAGGCCCCCTAAAGATCGCAGACTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTATCTAATCTTGC  
GCGTGCCCATCTCTATCCACCGGAGTTTTCAATTTAAAATGATGCCATTCTAAATATTATGGGGTATTAATCTTCTTTTCG  
AAAGGCTATCCCCCTGATAAAGGCAGGTTGCACACGTGTTCCGCACCCGTACGCCGCTCTCAAGATCCCGAAAGATCTC  
TA

ID: 98

*Chryseobacterium*

ACTTCAGGTACCCCAAACCTTCCATGGCTTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTACCGCGCCATGGCTG  
ATGCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCATAGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGAACTGAGACC GGCTTTTCGAGATT  
CGCATCCTATCGCTAGGTAGCTGCCCTCTGTACCGGCCATTGTATTACGTGTGTGGCCCAAGGCGTAAGGGCCGTGATG  
ATTTGACGTCATCCCCACCTTCTCTACTTGCGTAGGCAGTCTCACTAGAGTCCCCAACTGAATGATGGCAACTAGTG  
ACAGGGGTTGCGCTCGTTGCAGGACTTAACCTAACACCTCACGGCACGAGCTGACGACAACCATGCAGCACCTTGAAA  
ATTGTCCGAAGAAAAGTCTATTTCTAAACCTGTCAATTCCCATTAAAGCCTTGGTAAGGTTCTCGCGTATCATCGAATT  
AAACCACATAATCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCATTCTTGCGAACGTACTCCCCAGGTGGC  
TAACTTATCACTTTTCGCTTAGTCTCTGAATCCGAAAACCCAAAACGAGTTAGCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGG  
GTATCTAATCCTGTTTCGCTCCCCACGCTTTCGTCCATCAGCGTCAGTTAAAACATAGTGACCTGCCTTCGCAATTGGTGT  
TCTAAGTAATATCTATGCATTTACCGCTACACTACTTATTCCAGCCACTTCTACTTTACTCAAGACCTGCAGTATCAAT  
GGCAGTTTCATAGTTAAGCTATGAGATTTACCACTGACTTACAGATCCGCCTACGGACCCTTTAAACCCAATAAATCC  
GGATAACGCTTGCACCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGTGCTTATTCGTATAGTACCTTCAGCT  
TTCCACACGTGGAAAGGTTTATCCCTATACAAAAGAAGTTTACAACCCATAGGGCCGTGTCCTTCACGCGGGATGGCT  
GGATCAGGCTCTCACCCATTGTCCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGTCCGTGTCTCAGTACCAGTGT  
GGGGGATCACCCCTCTCAGGCCCCCTAAAGATCACTGACTTGGTAGGCCGTTACCTACCAACTATCTAATCTTGC GCGT  
GCCCATCTCTATCCACCGGAGTTTTCAATAATAAGTGATGCCACTCATTATATTATGGGGTATTAATCTTCTTTTCGAAA  
GGCTATCCCCCTGATAAAGGCAGGTTGCACACGTGTTCCGCACCCGTACGCCGCTCTCAAAGATCCGAAGATCTTC

ID: 108

*Stenotrophomonas*

ACAAGGCCCGGGAACGTATTACCGCAGCAATGCTGATCTGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGC  
AGACTCCAATCCGGACTGAGATAGGGTTTCTGGGATTGGCTTGCCCTCGCGGGTTTGCAGCCCTCTGTCCCTACCATTGT

AGTACGTGTGTAGCCCTGGTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACACGGCGGTC  
TCCTTAGAGTTCCCACCATTACGTGCTGGCAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCA  
CGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTTTCGAGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCTCGA  
CATGTCAAGACCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACCACATACTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAA  
TTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCAGCCGTACTCCCCAGGCGGCGAACTTAACGCGTTAGCTTCGATACTGCGTGCCTAAAT  
GCACCCAACATCCAGTTCGCATCGTTTAGGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGTGC  
CTCAGTGTGAGTGTGGTCCAGGTAGCTGCCTTCGCCATGGATGTTCTCCCGATCTCTACGCATTTCACTGCTACACCG  
GGAATTCCACTACCCTCTACCACACTCTAGTCGCCAGTATCCACTGCAATTCCAGGTTGAGCCCAGGGCTTTCACAAC  
AGACTTAAACAACCACCTACGCACGCTTACGCCAGTAATTCCGAGTAACGCTTGCACCCTTCGTATTACCGCGGCTG  
CTGGCACGAAGTTAGCCGGTGCTTATTCTTTGGGTACCGTCAGAACAACCGGGTATTAGCCGACTGCTTTTCTTTCCCAA  
CAAAGGGCTTACAAACCCGAAGGCCTTCTTACCCACGCGGTATGGCTGGATCAGGCTTGCGCCATTGTCCAATATT  
CCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCAGTGTGGCTGATCATCCTCTCAGACCAGCTACGGA  
TCGTGCGCTTGGTGGGCCTTACCCCGCCAACTAGCTAATCCGACATCGGCTCATCTATCCGCGCAAGGCCCGAAGGTC  
CCCTGCTTTCACCCGAAGGTCGTATGCGGTATTAGCGTAAGTTTCCCTACGTTATCCCCCACGAAAAGGTAGATTCCGAT  
GTATTCCTCACCCGTCCGCCACTCGCCACCCATAAGAGCAAGCTTACTGTGCTGCCGTTTCGACTGCA

ID: 111

*Chryseobacterium*

ACTTCAGGTACCCCAGACTTCCATGGCTTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGCCATGGCTG  
ATGCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCATAGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGAAGTGAAGACCAGCTTTCGAGATT  
TGCATCACGTCACCGTGTAGCTGCCCTCTGTACTGGCCATTGTATTACGTGTGTGGCCCAAGGCGTAAGGGCCGTGATG  
ATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCTCTACTTGCGTAGGCAGTCTCACTAGAGTCCCCAACTTAATGATGGCAACTAGTG  
ACAGGGGTTGCGCTCGTTGCAGGACTTAACCTAACACCTCACGGCACGAGCTGACGACAACCATGCAGCACCTTGAAA  
AATGTCCGAAGAAAAGTCTATTTCTAAACCTGTCATTTCCCATTTAAGCCTTGGTAAGGTTCCCTCGCGTATCATCGAATT  
AAACCACATAATCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCATTCTTGCGAACGTACTCCCCAGGTGGC  
TAACTTATCACTTTCGCTTAGTCTCTGAATCCGAAAATCCAAAACGAGTTAGCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGG  
GTATCTAATCCTGTTTCGCTCCCCACGCTTTCGTCCATCAGCGTCAGTTGTTGCTTAGTAACCTGCCTTCGCAATTGGTGT  
CTAAGTAATATCTATGCATTTACCGCTACACTACTTATTCCAGCTACTTCAACAACACTCAAGACCTGCAGTATCAATG  
GCAGTTTCACAGTTAAGCTGTGAGATTTACCACTGACTTACAGATCCGCCTACGGACCCTTTAAACCCAATAAATCCG  
GATAACGCTTGCACCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGTGCTTATTTCGTATAGTACCTTCAGCTA  
CCCTCACGAGAGTAGGTTTATCCCTATACAAAAGAAGTTTACAACCCATAGGGCAGTCGTCCTTCACGCGGGATGGCTG  
GATCAGGCTCGCACCCATTGTCCAATATTCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGARTCTGGTCCGTGTCTCAGTACCAGTGTG  
GGGATCACCTCTCAGGCCCCCTAAAGATCGCAGACTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTATCTAATCTTGCGCGTG  
CCCATCTCTATCCACCAGAGTTTCAATTTAAAATGATGCCATTCTAAATATTATGGGGTATTAATCTTCTTTCGAAAG



GCTATCCCCCTGATAAAGGCAGGTTGCACACGTGTTCCGCACCCGTACGCCGCTCTCAAGATCCCGAAAGATCTCTAC  
CGCTCGGCTGCA

ID: 114

*Chryseobacterium*

ACCCCAAACCTTCCATGGCTTGACGGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAAACGTATTCACCGCGCCATGGCTGATGCGCGAT  
TACTAGCGATTCCAGCTTCATAGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGAAGTACGACCGGCTTTCGAGATTTCGCATCTTAT  
CACTAAGTAGCTGCCCTCTGTACCGGCCATTGTATTACGTGTGTGGCCCAAGGCGTAAGGGCCGTGATGATTTGACGTC  
ATCCCCACCTTCCTCTCTACTTGCGTAGGCAGTCTCACTAGAGTCCCCAACTGAATGATGGCAACTAGTGACAGGGGTTT  
GCTCGTTGCAGGACTTAACCTAACACCTCACGGCACGAGCTGACGACAACCATGCAGCACCTTGAAAATTGTCCGAAGA  
AAAGTCTATTTCTAAACCTGTCAATTCCCATTAAAGCCTTGGTAAGGTTCCCTCGCGTATCATCGAATTAACCACATAAT  
CCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCATTCTTGCGAACGTAATCCCCAGGTGGCTAACTTATCACT  
TTCGCTTAGTCTCTGAACCCGAAAGCCCAAAAACGAGTTAGCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCT  
GTTTCGCTCCCCACGCTTTCGTCCATCAGCGTCAGTTAAAACATAGTGACCTGCCTTCGCAATTGGTGTCTAAGTAATAT  
CTATGCATTTACCGCTACACTACTTATTCCAGCCACTTCTACTTTACTCAAGACCTGCAGTATCAATGGCAGTTTCATA  
GTTAAGCTATGAGATTTACCACTGACTTACAGATCCGCCTACGGACCCTTTAAACCCAATAAATCCGGATAACGCTTG  
CACCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGTGCTTATTCATACTGTACCTTCAGCTACTCTCACGAGA  
GTAGGTTTATCCCAGTATAAAAAGAAGTTTACAATCCATAGAACCGTCGTCCTTCACGCGGGATGGCTGGATCAGGCTCT  
CACCCATTGTCCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGTCCGTGTCTCAGTACCAGTGTGGGGGATCACCC  
TCTCAGGCCCCCTAAAGATCACTGACTTGGTAGGCCGTTACCCTACCAACTATCTAATCTTGCGCGTGCCATCTCTATC  
CACCGGAGTTTTCAATAACCAACTGATGCCAGTCAATATATTATGGGGTATTAATCTTCTTTTCGAAAGGCTATCCCCCTG  
ATAAAGGCAGGTTGCACACGTGTTCCGCACCCGTACGCCGCTCTCTCTGTCCCGAAAGACAAAT

ID: 133

*Chryseobacterium*

ACCCAGACTTCCATGGCTTGACGGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAAACGTATTCACCGCGCCATGGCTGATGCGCGAT  
TACTAGCGATTCCAGCTTCATAGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGAAGTACGACCGGCTTTCGAGATTTCGCATCACA  
TCGCTGTGTAGCTGCCCTCTGTACCGGCCATTGTATTACGTGTGTGGCCCAAGACGTAAGGGCCGTGATGATTTGACGTC  
ATCCCCACCTTCCTCTCTACTTGCGTAGGCAGTCTCACTAGAGTCCCTCAACTGAATGTTAGCAACTAGTGACAGGGGTTG  
CGCTCGTTGCAGGACTTAACCTAACACCTCACGGCACGAGCTGACGACAACCATGCAGCACCTTGAAAATGTCCGAA  
GAAGGATCTATTTCTAAATCTGTCAATTTCCCATTAAAGTCTTGGTAAGGTTCCCTCGCGTATCATCGAATTAACCACATA  
ATCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCATTCTTGCGAACGTAATCCCCAGGTGGCTAACTTATCA  
CTTTCGCTTAGTCTCTGAATCCGAAGACCCCAAAAACGAGTTAGCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATC  
CTGTTTCGCTCCCCACGCTTTCGTCCATCAGCGTCAGTTAAAACATAGTGACCTGCCTTCGCAATTGGTGTCTAAGTAAT

ATCTATGCATTTACACGCTACACTACTTATTCCAGCCACTTCTACTTTACTCAAGACCTGCAGTATCAATGGCAGTTTCAT  
AGTTAAGCTATGAGATTTACCACTGACTTACAGATCCGCCTACGGACCCTTTAAACCCAATAAATCCGGATAACGCTT  
GCACCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGTGCTTATTCGTATAGTACCTTCAGCTTTCCACACGTG  
GAAAGGTTTATCCCTATACAAAAGAAGTTTACAACCCATAGGGCCGTCGTCCTTCACGCGGGATGGCTGGATCAGGCTC  
TCACCATTGTCCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGTCCGTGTCTCAGTACCAGTGTGGGGGATCACC  
CTCTCAGGCCCCCTAAAGATCATTGACTTGGTAGGCCGTTACCCTACCAACTATCTAATCTTGCGCGTGCCCATCTCTAT  
CCACCGGAGTTTTCAATAAGCCAAGATGCCTTGGTTTATATTATGGGGTATTAATCTTCCTTTTCGAAAGGCTATCCCCCT  
GATAAAGGCAGGTTGCACACGTGTTCCGCACCCGTGCGCCGCTCTCAAAGT

ID: 164

*Enterobacter sp*

GTAAAGCTACCTACTTCTTTTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACC  
GTAGCATTCTGATCTACGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTACGACGTA  
CTTTATGAGGTCCGCTTGCTCTCGCGAGGTCGCTTCTCTTTGTATACGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACTCGTAA  
GGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCCTCCAGTTTATCACTGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCGGCCGAACCGC  
TGGCAACAAAGGATAAAGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATTTACAACACGAGCTGACGACAGCCATGC  
AGCACCTGTCTCACGGTTCCCGAAGGCACTAAAGCATCTCTGCTAAATTCCGTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTT  
CGCGTTGCATCGAATTAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCC  
GTACTCCCCAGGCGGTCGACTTAACGCGTTAGCTCCGGAAGCCACTCCTCAAGGGAACAACCTCCAAGTCGACATCGTT  
TACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTGAGCGTCAGTCTTTGTCCAGGGGG  
CCGCYTTCCGCCACCGGTATTCCTCCAGATCTCTACGCATTTACCGCTACACCTGGAATTCTACCCCCCTCTACAAGACT  
CTAGCCTGCCAGTTTCGAATGCAGTTCCCAGGTTGAGCCCAGGGATTTACATCCGACTTGACAGACCGCCTGCGTGCG  
CTTTACGCCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGCACCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGTGCTTCT  
TCTGCGAGTAACGTCAATCACTAAGGTTATTAACCTCAACGCCTTCTCCTCGCTGAAAGTACTTTACAACCCGAAGGCC  
TTCTTCATACACGCGGCATGGCTGCATCAGGCTTGCGCCATTGTGCAATATTCCTCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCT  
GGACCGTGTCTCAGTTCAGTGTGGCTGGTCATCCTCTCAGACCAGCTAGGGATCGTCGCCTAGGTGAGCCATTACCCC  
ACCTACTAGCTAATCCCATCTGGGCACATCTGATGGCAAGAGGCCCGAAGGTCCCCCTCTTTGGTCTTGCAGCGTTATGC  
GGTATTAGCTACCGTTTCCAGTAGTTATCCCCCTCCATCAGGCAGTTTCCCAGACATTACTACCCGTCCGCCGCTCGTC  
ACCCGAGAGCAAGCTCTCTGTGCTACCGCTCGAC

ID: 208

*Flavobacterium*

GCACCCCAGCTTCCATGGCTTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGGATCATGGCTGATATCCG  
ATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGGAGTCGAGTTGCAGACTCCGATCCGAAGTGTGACCGGTTTTATAGATTGCTCCTG

GTCGCCCAGTGGCTGCTCTGTACCGGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAAGGCGTAAGGGCCGTGATGATTTGACG  
TCATCCCCACCTTTCCTCACAGTTTGCAGTCTTGTTAGAGTTCCCGACATGACTCGCTGGCAACTAACACAGGG  
GTTGCGCTCGTTATAGGACTTAACCTGACACCTCACGGCACGAGCTGACGACAACCATGCAGCACCTTGTAATTTGTCTT  
GCGAAAGATCTGTTTCCAAACCGGTCAAACCTACATTTAAGCCTTGGTAAGGTTCCCTCGCGTATCATCGAATTAACCAC  
ATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCATTCTTGCGAACGTACTCCCCAGGTGGGATACTTA  
TCACTTTCGCTTAGCCACTGAAATTGCTTCCAACAGCTAGTATCCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATC  
CTGTTTCGCTACCCACGCTTTCGTCCATCAGCGTCAATCCATTAGTAGTAACCTGCCTTCGCAATTGGTATTCCATGTAAT  
CTCTAAGCATTTACACCGCTACACTACATATTCTAGTTACTTCCTAAAATTCAAGTTTAGCAGTATCAATGGCCGTTCCAC  
CGTTGAGCGATGGGCTTTCACCACTGACTTACTAAACCGCCTACGGACCCTTTAAACCCAATGATTCCGGATAACGCTT  
GGATCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGATCCTTATTCTTACGATAACCGTCAAGCTCCTTCACGAA  
GGAGTGTTTCTTCTCGTACAAAAGCAGTTTACAATCCATAGGACCGTCATCCTGCACGCGGCATGGCTGGATCAGGCTT  
GCGCCATTGTCCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGTCCGTGTCTCAGTACCAGTGTGGGGGATCTCC  
CTCTCAGGACCCCTACCCATCGTAGCCTTGGTAAGCCGTTACCTTACCAACTAGCTAATGGGACGCATGCTCATCTTTTA  
CCGTTGTGACTTTAATAGTATCTCGATGCCGAGTCACTATACTATGAGGTATTAATCCAAATTTCTCTGGGCTATCCCTC  
TGTAAGGTTAGATTGCATACGCGTTACGCACCCGTGCGCCGGTCTCTATATCCGAAGACA

ID: 214

*Comamonas*

GCTACCTACTTCTGGCGAGACCCGCTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTATTCACCGTGAC  
ATTCTGATCCACGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGACTGGCTTTAT  
GGGATTAGCTCCCCCTCGCGGGTTGGCAACCCTTTGTACCAGCCATTGTATGACGTGTGTAGCCCCACCTATAAGGGCC  
ATGAGGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCCCATTAGAGTGCCCTTTCGTAGCAACTAAT  
GGCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTT  
ACGGTTCTCTTTCGAGCACATGTCCATCTCTGGTCACTTCCGTACATGTCAAAGGTGGGTAAGGTTTTTCGCGTTGCATC  
GAATTAACCACATCATCCACCGCTTGTGCGGGTCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAG  
GCGGTCAACTTCACGCGTTAGCTTCGTTACTGAGAAAGTTAATTCCCAACAACCAGTTGACATCGTTTAGGGCGTGGAC  
TACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCACGCTTTCGTGCATGAGCGTCAGTACAGGTCCAGGGGATTGCCTTCGCCA  
TCGGTGTTCCTCCGCATATCTACGCATTTCACTGCTACACGCGGAATTCCATCCCCCTTACCGTACTCTAGCTATGCAG  
TCACAAAGGCCGTTCCAGGTTGAGCCCGGGATTTCACCTCTGTCTTACATAACCGCCTGCGCACGCTTTACGCCAGT  
AATTCGATTAACGCTTGCACCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGTGCTTATTCTTACGGTACCG  
TCATGGACCCTCTTTATTAGAAAGAGTCTTTTCGTTCCGTACAAAAGTAGTTTACAACCCGAGGGCCTTCATCCTACACG  
CGGCATTGCTGGATCAGGCTTTCGCCATTGTCCAAAATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCA  
GTCCCAGTGTGGCTGGTTCCTCTCAGACCAGCTACAGATCGTCCGGCTTGGTAAGCTTTTATCCCACCAACTACCTAAT

CTGCCATCAGCCGCTCTAGTAGCGCAAGGCCCGAAGGTCCCCTGCTTTCATCCTTAGATCTCATGCGGTATTAGCTACTC  
TTTCGAGTAGTTATCCCCACTACTAGGCACGTTCCGATGTGTTACTCACCCGTTTCGCCACTCGTCAGCATCCGAAGACC

ID: 223

*Dermaococcus*

ACCGGCTTCGGGTGTTACCAACTTTCGTGACTTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCAGCACT  
GCTGATCTGCGATTACTAGCGACTCCAACCTTCATGGGGTCGAGTTGCAGACCCCAATCCGAAGTGGAGACCGGTTTTAAG  
GGATTCGCTCCACCTCACGGTATCGCAGCCCTCTGTACCGGCCATTGTAGCATGCGTGAAGCCCAAGACATAAGGGGCA  
TGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGAGTTGACCCCGGCAGTCTCCCATGAGTCCCCACCATTACGTGCTGGCA  
ACATGGAACGAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCAC  
CTGTACACCAGCCAAAAGGCTGCACCATCTCTGGCACATTCCGGTGTATGTCAAGCCTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCA  
TCGAATTAATCCGCATGCTCCGCCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCCTTTGAGTTTTAGCCTTGCGGCCGTACTCCCC  
AGGCGGGGCGCTTAATGCGTTAGCTGCGGCACGGAACCTCGTGGAAATGAGTCCCACACCTAGCGCCCAACGTTTACGGC  
ATGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCATGCTTTCGCTTCTCAGCGTCAGTAATGGCCCAGAGACCTGCCT  
TCGCCATCGGTGTTCCCTCCTGATATCTGCGCATTTACCGCTACACCAGGAATTCCAGTCTCCCCTACCATACTCTAGCC  
TGCCCGTACCCACTGCAGAACCAGGAGTTAAGCCCCGGTCTTTCACAGCAGACGCGACAAACCGCCTACAAGCTCTTTAC  
GCCAATAATTCCGGACAACGCTCGCACCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGTGCTTCTTCTCCA  
GGTACCGTCACTTTCGCTTCGTCCCTGGTAAAAGAGGTTTACAACCCGAAGGCCTTCATCCCTCACGCGGGCGTCGCTGCA  
TCAGGCTTTCGCCCATTTGTGCAATATCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGC  
CGGTCACCCTCTCAGGCCGGCTACCCGTCAAAGCCTTGGTGAGCCACTACCTACCAACAAGCTGATAGGCCGCGGAGTC  
CATCCTTCACCAAAAAATCTTTCCACACACGACCATGCGATCATGAATGAATATCCAGTATTAGACCTCGTTTCCAAGG  
CTTATCCCAGAGTGAAGGGCAGGTTACTCACGTGTTACTCACCCGTTTCGCCACTAATCCATCACAGCAAGCTGTGACTTC  
ATCGTTCGACTGC

ID: 238

*Aeromicrobium*

TAACGGTTAGGCCACTGGCTTCGGGTGTTGCCGACTTTCATGACGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTAT  
TCACCGCAGCGTTGCTGATCTGCGATTACTAGCGACTCCGACTTCATGGGGTCGAGTTGCAGACCCCAATCCGAAGTGA  
GACCGGCTTTTTGGGATTCGCTCCACCTTACAGTTTCGCAGCCCTTTGTACCGGCCATTGTAGCATGCTTGAAGCCCTGG  
ACATAAGGGGCATGAAGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGAGTTGACCCCGGCAGTCTCCTATGAGTCCCCACCA  
TAACGTGCTGGCAACATAGAACGAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGAC  
AGCCATGCACCACCTGTATACCGACCAAAAAGGGGGCCACATCTCTGCAGCTTTCGGGTATATGTCAAACCCAGGTAAGG  
TTCTTCGCGTTGCATCGAATTAATCAGCATGCTCCGCCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCCTTTGAGTTTTAGCCTTGC  
GGCCGTACTCCCCAGGCGGGGCGCTTAATGCGTTAGCTGCGGCACGGAGACCGTGGAAAGGTCCCCACACCTAGCGCCC

AACGTTTACGGCATGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTCGCTCCCCATGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGGTAATGCC  
AGAGAACCGCCTTCGCCACCGGTGTTCCCTCCTGATATCTGCGCATTCCACCGCTACACCAGGAATTCCGTTCTCCCCTGC  
ATACCTCTAGTCTGCCCCGTATCGGAAGCACGCTCAGGGTTGAGCCCTGAGTTTTACTCCCAGCGGACAAACCGCCTA  
CGAGCCCTTTACGCCAATAATTCCGGACAACGCTCGGACCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTGGCCGG  
TCCTTCTTCTGCAGGTACCGTCACTCTCGCTTCGTCCCTGCTGAAAGAGGTTTACAACCCGAAGGCCGTATCCCTCAG  
CGGCGTTGCTGGATCAGGCTTTCGCCCATTTGTCCAATATCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCA  
GTCCCAGTGTGGCCGGTCACCCTCTCAGGCCGGCTACCCGTC AATGCCTTGGTGAGCCATTACCTCACCAACAAGCTGA  
TAGGCCGCGAGCTCATCCTTCTCCGCCGGAGCTTTCCACCTCCAAACATGCGAAAGGAGGTCATATTCGGCATTAGCCA  
TCGTTTCCAATGGTTATTCCAAAGAGAAGGGCAGATTGCTCACGTGTTACTACCCGTTTCGCCGCTCGTGTACCCCGAA

244

*Variovorax*

CTACTTCTGGCAGAACCCGCTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTATTCACCGTGACATTCT  
GATCCACGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGACTGGTTTTATGGGA  
TTAGCTCCCCCTCGCGGGTTGGCAACCCTTTGTACCAGCCATTGTATGACGTGTGTAGCCCCACCTATAAGGGCCATGAG  
GACTTGACGTCATCCCCACCTTCCCTCCGGTTTATCACCGGCAGTCTCACTAGAGTGCCCAACTAAATGTAGCAACTAATG  
ACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTTA  
CGGTTCTCTTTCGAGCACTAAGCCATCTCTGGCGAATTCCGTACATGTCAAAGGTGGGTAAAGTTTTTCGCGTTGCATCG  
AATTAACACATYATCCACCGCTTGTGCGGGTCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGG  
CGGTCAACTTCACGCGTTAGCTTTCGTTACTGAGAAAGTGAATTCCCAACAACCAGTTGACATCGTTTAGGGCGTGGACT  
ACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCACGCTTTCGTGCATGAGCGTCAGTACAGGTCCAGGGGATTGCCTTCGCCAT  
CGGTGTTCCCTCCGCATATCTACGCATTTCACTGCTACACGCGGAATTCCATCCCCCTYACCGTACTCTAGCTATACAGT  
CACAGATGCAGTTCCAGGTTGAGCCCCGGGGATTTCACAACTGTCTTATATAACCGCCTGCGCACGCTTTACGCCAGT  
AATTCGATTAACGCTCGCACCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGTGCTTATTCTTACGGTACCG  
TCATGGGCCCCCTTGATTAGAAAGGACCTTTTCGTTCCGTACAAAAGCAGTTTACAACCCGAAGGCCTTCATCCTGCACG  
CGGCATTGCTGGATCAGGCTTGCGCCCATTTGTCCAAAATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCA  
GTTCCAGTGTGGCTGGTTCCTCTCAGACCAGCTACAGATCGCAGGCTTGGTGAGCCTTTACCTCACCAACTACCTAAT  
CTGCCATCGGCCGCTCCACTCGCGCAGGCTTTCGATCCCCCGCTTTCATCCGTAGATCTTATGCGGTATTAGCACAGC  
TTTCGCTGCGTTATCCCCACGATTGGGCACGTTCCGATGTATTACTACCCGTTTCGCCACTCGTCAGCATC

ID: 259

*Stenotrophomonas*

GCTACCTGCTTCTGGTGCAACAACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCAGC  
AATGCTGATCTGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTGAGATAGGGTTT

CTGGGATTGGCTTGCCCTCGCGGGTTTGCAGCCCTCTGTCCCTACCATTGTAGTACGTGTGTAGCCCTGGTCGTAAGGGC  
CATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACACCGGCGGTCTCCTTAGAGTTCCCACCATTACGTGCTGG  
CAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACAGAGTGACGACAGCCATGCAGCAC  
CTGTGTTTCGAGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCTCGACATGTCAAGACCAGGTAAGGTTCTTCGCGTT  
GCATCGAATTAACACATACTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGACCGTACTC  
CCCAGGCGGGCAACTTAACGCGTTAGCTTCGATACTGCGTGCCAAATTGCACCCAACATCCAGTTCGCATCGTTTAGGG  
CGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCCACGCTTTCGTGCCTCAGTGTGAGTGTGGTCCAGGTAGCTGCC  
TTCGCCATGGATGTTCTCCCGATCTCTACGCATTTCACTGCTACACCGGGAATTCCTACTACCCTCTACCACACTCTAGT  
CGCCCAGTATCCACTGCAATTCCCAGGTTGAGCCCAGGGCTTTCACAACAGACTTAAACAACCACCTACGCACGCTTTA  
CGCCCAGTAATTCCGAGTAACGCTTGCACCCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGGTGCTTATTCTTT  
GGGTACCGTCAGAACAAACCGGGTATTAGCCGACTGCTTTTCTTTCCCAACAAAAGGGCTTTACAACCCGAAGGCCTTCT  
TCACCCACGCGGTATGGCTGGATCAGGCTTGCGCCATTGTCCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGAC  
CGTGTCTCAGTTCAGTGTGGCTGATCATCCTCTCAGACCAGCTACGGATCGTCGCCTTGGTGGGCCTTTACCCCGCCAA  
CTAGCTAATCCGACATCGGCTCATCTATCCGCGCAAGGCCCGAAGGTCCCCTGCTTTCACCCGAAGGTGATGCGGTA  
TTAGCGTAAGTTTCCCTACGTTATCCCCCACGAAAAGGTAGATTCCGATGTATTCTCACCCGTCCGCCACTCGCCACCC  
ATAAGAGCAA

ID: 284

*Variovorax*

CTACTTCTGGCAGAACCCGCTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTATTCACCGTGACATTCT  
GATCCACGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGACTGGTTTTATGGGA  
TTAGCTCCCCCTCGCGGGTTGGCAACCCTTTGTACCAGCCATTGTATGACGTGTGTAGCCCCACCTATAAGGGCCATGAG  
GACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACACCGGCGAGTCTCATTAGAGTGCCCAACTGAATGTAGCAACTAATG  
ACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTTA  
CGGTTCTCTTTCGAGCACTAAGCCATCTCTGGCGAATTCCGTACATGTCAAAGGTGGGTAAAGTTTTTCGCGTTGCATCG  
AATTAACACATCATCCACCGCTTGTGCGGGTCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGGCCGTACTCCCCAGG  
CGGTCAACTTCACGCGTTAGCTTCGTTACTGAGTCAGTGAAGACCCAACAACCAGTTGACATCGTTTAGGGCGTGGACT  
ACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCCACGCTTTCGTGCATGAGCGTCAGTACAGGCCAGGGGATTGCCTTCGCCAT  
CGGTGTTCTCCGCATATCTACGCATTTCACTGCTACACGCGGAATTCCATCCCCCTCTGCCGTACTCCAGCGATGCAGT  
CACAGATGCAGTTCAGGTTGAGCCCAGGGGATTTACAACACTGTCTTACATCACCGCCTGCGCACGCTTTACGCCAGT  
AATTCGATTAACGCTTGCACCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGTGCTTATTCTTACGGTACCG  
TCATTAGCCTTCTTTATTAGAAAAGACCGTTTCGTTCCGTACAAAAGCAGTTTACAACCCGAAGGCCTTCATCCTGCACG  
CGGCATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCATTGTCCAAAATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCA  
GTCCCAGTGTGGCTGGTTCCTCTCAGACCAGCTACAGATCGAAGGCTTGGTGAGCCTTTACCTCACCAACTACCTAAT

CTGCCATCGGCCGCTCCATTCGCGCAAGGTCTTGCGATCCCCTGCTTTCATCCGTAGATCGTATGCGGTATTAGCACAGC  
TTTCGCTGCGTTATCCCCACGATTGGGCACGTTCCGATGTATTACTACCCGTTTCGCCACTCGCCGCCAGGATTGCTC

ID: 292

*Citrobacter*

GAAGGTTAAGCTACCTACTTCTTTTGAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATT  
CACCGTGGCATTCTGATCCACGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGGAGTCGAGTTGCAGACTCCGATCCGGACTACGA  
CATACTTTATGAGGTCCGCTTGCTCTCGCGAGGTCGCTTCTCTTTGTATATGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACTCG  
TAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCCTCCAGTTTATCACTGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCGGCCGAAC  
CGCTGGCAACAAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATTTACAACACGAGCTGACGACAGCCA  
TGCAGCACCTGTCTCAGAGTTCCCGAAGGCACCAAAGCATCTCTGCTAAGTTCTCTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTT  
CTTCGCGTTGCATCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCG  
GCCGTACTCCCCAGGCGGTGACTTAACGCGTTAGCTCCGGAAGCCACTCCTCAAGGGAACAACCTCCAAGTCGACATC  
GTTTACAGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTGAGCGTCAGTCTTTGTCCAGG  
GGGCCGCCTTCGCCACCGGTATTCCCTCCAGATCTCTACGCATTTACCGCTACACCTGGAATTCTACCCCCCTCTACAAG  
ACTCTAGCCTGCCAGTTTCGGATGCAGTTCCCAGGTTGAGCCCCGGGGATTTACATCCGACTTGACAGACCGCCTGCGT  
GCGCTTTACGCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGCACCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGTGCT  
TCTTCTGCGAGTAACGTCAATCGYCAAGGTTATTAACCTTAACGCCTTCCTCCTCGCTGAAAGTACTTTACAACCCGAAG  
GCCTTCTTCATACACGCGGCATGGCTGCATCAGGCTTGCGCCCATTTGTGCAATATCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAG  
TCTGGACCGTGTCTCAGTTCAGTGTGGCTGGTCATCCTCTCAGACCAGCTAGGGATCGTCGCCTAGGTGAGCCATTACC  
TCACCTACTAGCTAATCCCATCTGGGCACATCTGATGGCATGAGGCCCGAAGGTCCCCCACTTTGGTCTTGCGACGTTAT  
GCGGTATTAGCTACCGTTTCCAGTAGTTATCCCCCTCCATCAGGCAGTTTCCCAGACATTACTACCCGTCCGCCGCTCG  
TCACCCAAAGAGCAAGCTCTTCTGTGCTACCGCTCGAC

ID: 300

*Vogesella*

CACTCCCATGGTGTGACGGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTACCCGCAGCATGCTGATCTGCGATTACTAGC  
GATTCCGACTTCATGCACTCGAGTTGCAGAGTGCAATCCGGACTACGATCGGTTTTATGAGATTAGCTCCACCTCGCGG  
CTTCGCAACCCTCTGTACCGACCATTGTATGACGTGTGAAGCCCTAGCCATAAGGGCCATGAGGACTTGACGTCATCCC  
CACCTTCCTCCGTTTTGTCACCGGCAGTCCCATTAGAGTGCCCAACTTAATGCTGGCAACTAATGGCAAGGGTTGCGCTC  
GTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTCCAGATTCCCTTTCGGG  
CACCCCTACCTTTCAGCAGGGTTCCTGGCATGTCAAGGCTAGGTAAGGTTTTTCGCGTTGCATCGAATTAATCCAMATC  
ATCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTCAATT  
TCACGCGTWAGCTACGCTACCAAGGATTCTAACCCCAACAGCTAATTGACATCGTTTTAGGGCGTGGACTACCAGGGTA

TCTAATCCTGTTTGGCTCCCCACGCTTTCGTGCATGAGCGTCAGTATCATCCCAGGGGGCTGCCTTCGCCATCGGTGTTCC  
TCCACATCTCTACGCATTTCACTGCTACACGTGGAATTCCACCCCCCTCTGACGTA CTCTAGCTTGACAGTTTCAAACGC  
AGTTCCCAGGTTAAGCCCGGGGATTTACATCTGACTTATCAAACCGCCTGCGCACGCTTTACGCCCAGTAATTCCGATT  
AACGCTTGCACCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGTGCTTATTCTTCCAGTACTGTCATCCCTAC  
AACGTATTAAGTCGTAGGCTTTCCTCCCGGACAAAAGAGCTTTACAACCCGAAGGCCTTCTTCACTCACGCGGCATGGC  
TGGATCAGGCTTGCGCCATTGTCCAAAATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTG  
TGGCTGATCATCCTCTCAGACCAGCTACTGATCGTCGCCTTGGTGAGCCTTTACCCACCAACTAGCTAATCAGACGTCG  
GCCGCTCGAATAACGCGAGGCCCAAAGGTCCCCCGCTTTCCTCCTCAGAGCGTATGCGGTATTAGCACACCTTTTCGATG  
CGTTATCCCCATTACTCGGCACGTTCCGACGCATTACTACCCGTTCCGCACTCGCCACCAGGCCGAAGCCC

ID: 310

*Microbacterium*

GTTACCGACTTTCATGACTTGACGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTATTCACCGCAGCGTTGCTGATCTGCGAT  
TACTAGCGACTCCGACTTCATGAGGTTCGAGTTGCAGACCTCAATCCGAACTGGGACCGGCTTTTTGGGATTCGCTCCAC  
CTCGCGGTATTGCAGCCCTTTGTACCGGCCATTGTAGCATGCGTGAAGCCCAAGACATAAGGGGCATGATGATTTGACG  
TCATCCCCACCTTCTCCGAGTTGACCCCGGCAGTATCCCATGAGTTCCACCATTACGTGCTGGCAACATAGAACGAG  
GGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTTTACGAGTG  
TCCAAAGAGTTGACCATTTCTGGCCCGTTCTCGTATATGTCAAGCCTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAATC  
CGCATGCTCCGCCGCTTGTGCGGGTCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAGCCTTGC GGCCGTA CTCCCCAGGCGGGGAAC  
TTAATGCGTTAGCTGCGTCACGGAATCCGTGGAATGGACCCCACTAGTTCCCAACGTTTACGGGGTGGACTACCAG  
GGTATCTAAGCCTGTTTGGCTCCCCACCCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACGGCCAGAGATCTGCCTTCGCCATCGGTG  
TTCCTCCTGATATCTGCGCATTCCACCGCTACACCAGGAATTCCAATCTCCCTACCGCACTCTAGTCTGCCCGTACCCA  
CTGCAGGCCCGAGGTTGAGCCTCGGGATTTACAGCAGACGCGACAAACCGCCTACGAGCTCTTACGCCCAATAATTC  
CGGATAACGCTTGCGCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGCGCTTTTTCTGCAGGTACCGTCACT  
TTCGCTTCTTCCCTGCTAAAAGAGGTTTACAACCCGAAGGCCGTCATCCCTCACGCGGCGTTGCTGCATCAGGCTTCCGC  
CCATTGTGCAATATCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGGTCACCCTCT  
CAGGCCGGCTACCCGTCGACGCCTTGGTGAGCCATTACCTACCAACAAGCTGATAGGCCGCGAGCCCATCCCCAACCG  
AAAAATCTTTCAAACGCAGACCATGCGGTACGTCACATATCCAGTATTAGACGCGGTTTCCAGCGCTTATCCCAGAG  
TCAGGGGCAGGTTGCTCACGTGTTACTACCCGTTCCGCACTGATCCCACAGAGCAAGCT

ID: 311

*Microbacterium*

ACCGACTTTCATGACTTGACGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTATTCACCGCAGCGTTGCTGATCTGCGATTAC  
TAGCGACTCCGACTTCATGAGGTTCGAGTTGCAGACCTCAATCCGAACTGGGACCGGCTTTTTGGGATTCGCTCCACCTC



GCGGTATTGCAGCCCTTTGTACCGGCCATTGTAGCATGCGTGAAGCCCAAGACATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCA  
TCCCCACCTTCCCTCCGAGTTGACCCCGGCAGTATCCCATGAGTTCCCACCATTACGTGCTGGCAACATAGAACGAGGGT  
TGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTTTACGAGTGTCC  
AAAGAGTTGACCATTTCTGGCCCGTTCTCGTATATGTCAAGCCTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAATCCGC  
ATGCTCCGCCGCTTGTGCGGGTCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAGCCTTGCGGCCGTACTIONCCCCAGGCGGGGAACTTA  
ATGCGTTAGCTGCGTCACGGAATCCGTGGAATGGACCCCACTAGTTCCCAACGTTTACGGGGTGGACTACCAGGGT  
ATCTAAGCCTGTTTGTCTCCCCACCCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACGGCCCAGAGATCTGCCTTCGCCATCGGTGTTT  
CTCCTGATATCTGCGCATTCCACCGCTACACCAGGAATTCCAATCTCCCCTACCGCACTCTAGTCTGCCCGTACCCACTG  
CAGGCCCGAGGTTGAGCCTCGGGATTTACAGCAGACGCGACAAACCGCCTACGAGCTCTTTACGCCCAATAATTCCGG  
ATAACGCTTGCGCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGCGCTTTTTCTGCAGGTACCGTCACTTTC  
GCTTCTCCCTGCTAAAAGAGGTTTACAACCCGAAGGCCGTCATCCCTCACGCGGCGTTGCTGCATCAGGCTTCCGCCCA  
TTGTGCAATATCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGGTACCCCTCTCAG  
GCCGGTACCCGTCGACGCCTTGGTGAGCCATTACCTCACCAACAAGCTGATAGGCCGCGAGCCCATCCCCAACCGAAA  
AATCTTTCCAAACGCAGACCATGCGGTACGTCACATATCCAGTATTAGACGCCGTTTCCAGCGCTTATCCCAGAGTCA  
GGGGCAGGTTGCTCACGTGTTACTACCCGTTTCGCCACTGATCCCACAGAGCAAGC

ID: 313

*Serratia*

AAGCTACCTACTTCTTTTGAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGTA  
GCATTCTGATCTACGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGGAGTCGAGTTGCAGACTCCGATCCGGACTACGACGTACTTT  
ATGAGGTCCGCTTGTCTCGCGAGTTCGCTTCTCTTTGTATACGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACTCGTAAGGGC  
CATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCCTCCGGTTTATCACCGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCACCATTACGTGCTGG  
CAACAAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATTTACAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGC  
ACCTGTCTCAGAGTTCCCGAAGGCACTAAGCTATCTCTAGCGAATTCTCTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTTCGC  
GTTGCATCGAATTAACACCATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTA  
CTCCCCAGGCGGTCGACTTAACGCGTTAGCTCCGGAAGCCACGCCTCAAGGGCACAACCTCCAAGTCGACATCGTTTAC  
AGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCCACGCTTTCGCACCTGAGCGTCAGTCTTYGTCCAGGGGGCCG  
CYTTCGCCACCGGTATTCCTCCAGATCTCTACGCATTTACCGCTACACCTGGAATTCTACCCCCCTCTACAAGACTCTA  
GCTTGCCAGTTTCAAATGCAGTTCCCACGTTAAGCGCGGGGATTTACATCTGACTTAACAAACCGCCTGCGTGCCTTT  
ACGCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGCACCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGARTTAGCCGGTGTCTTCTG  
CGAGTAACGTCAATGCACAGTGCTATTAACACTGAACCCTTCTCCTCGCTGAAAGTGCTTTACAACCCGAAGGCCTTCT  
TCACACACGCGGCATGGCTGCATCAGGCTTGCGCCCATTTGTGCAATATCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGA  
CCGTGTCTCAGTTCCAGTGTGGCTGGTCATCCTCTCAGACCAGCTAGGGATCGTCCGCTAGGTGAGCCATTACCCACCT  
ACTAGCTAATCCCATCTGGGCACATCTGATGGCATGAGGCCCGAAGGTCCCCCACTTTGGTCCGTAGACGTTATGCGGT

ATTAGCTACCGTTTCCAGTAGTTATCCCCCTCCATCAGGCAGTTTCCCAGACATTACTCACCCGTCCGCCGCTCGTC  
ACCCAGGAGCA

ID: 420

*Enterobacter*

TACTTCTTTTGTCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGTAGCATTCTG  
ATCTACGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGGAGTCGAGTTGCAGACTCCGATCCGGACTACGACATACTTTGTGAGGT  
CCGCTTGCTCTCGCGAGGTCGCTTCTCTTTGTATATGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCATGATG  
ACTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCAGTTTATCACTGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCAGGCGAACCCTGGCAACAAAG  
GATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATTTACAAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTC  
AGAGTTCCCGAAGGCACCAAAGCATCTCTGCTAAGTTCTCTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCG  
AATTAACACATGYTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGGCCGTAACCCAGG  
CGGTGACTTAACGCGTTAGCTCCGGAAGCCACTCCTCAAGGGAACAACCTCCAAGTCGACATCGTTTACGGCGTGGAC  
TACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCACGCTTTCGCACCTGAGCGTCAGTCTTTGTCCAGGGGGCCGCCTTCGCCA  
CCGGTATTCCTCCAGATCTCTACGCATTTACCGCTACACCTGGAATTCTACCCCCCTCTACAAGACTCTAGCCTGCCAG  
TTTCGAATGCAGTTCCCAGGTTGAGCCCGGGGATTTACATCCGACTTGACAGACCGCCTGCGTGCCTTTACGCCAGT  
AATTCCGATTAACGCTTGCACCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGTGCTTCTTCTGCGAGTAACG  
TCAATCACTGCGGTTATTAACCACAATGCCTTCTCCTCGCTGAAAGTACTTTACAACCCGAAGGCCTTCTTCATACACG  
CGGCATGGCTGCATCAGGCTTGCGCCCATTTGTGCAATATCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCA  
GTTCCAGTGTGGCTGGTCATCCTCTCAGACCAGCTAGGGATCGTCGCCTAGGTGAGCCATTACCCACCTACTAGCTAAT  
CCCATCTGGGCACATCTGATGGCAAGAGGCCCGAAGGTCCCCCTCTTTGGTCTTGCACGTTATGCGGTATTAGCTACC  
GTTTCCAGTAGTTATCCCCCTCCATCAGGCAGTTTCCCAGACATTACTCACCCGTCCGCCGCTCGTCACCCAGGAGCAAG  
CTCCCTGTGCTACCGCTCGACT

ID: 431

*Burkholderia*

GCGGTTAGACTAGCCACTTCTGGTAAAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTATTC  
ACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCATGCACTCGAGTTGCAGAGTGCAATCCGGACTACGAT  
CGGTTTTCTGGGATTAGCTCCCCCTCGCGGGTTGGCGACCCTCTGTTCCGACCATTGTATGACGTGTGAAGCCCTACCCA  
TAAGGGCCATGAGGACTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCCTTAGAGTGCTCTTGCGTAG  
CAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCASGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGC  
ACCTGTGTATCGGTTCTCTTTCGAGCACTCCCGAATCTCTTCAGGATCCGACCATGTCAAGGGTAGGTAAGGTTTTTCG  
CGTTGCATCGAATTAATCCACATCATCCACCGCTTGTGCGGGTCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAATCTTGCACCGT  
ACTCCCCAGGCGGTCAACTTCACGCGTTAGCTACGTTACTAAGGAAATGAATCCCCAACAACTAGTTGACATCGTTTAG

GGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGTGCATGAGCGTCAGTATTGGCCCAGGGGGCT  
GCCTTCGCCATCGGTATTCCTCCACATCTCTACGCATTTCACTGCTACACGTGGAATTCTACCCCCCTCTGCCATACTCTA  
GCTTGCCAGTCACCAATGCAGTTCCCAGGTTGAGCCCCGGGATTTACATCGGTCTTAACAACCCGCTGCGCACGCTT  
TACGCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGCACCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGTGCTTATTCT  
TCCGGTACCGTCATCCCCGACTGTATTAGAGTCAGGGATTTCTTTCCGGACAAAAGTGCTTTACAACCCGAAGGCCTTC  
TTCACACACGCGGCATTGCTGGATCAGGCTTTCGCCATTGTCCAAAATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGG  
CCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCTGGTCGTCTCTCAGACCAGCTACTGATCGTCGCCTTGGTAGGCTTTTACCCTACCA  
ACTAGCTAATCAGCCATCGGCCAACCTATAGCGCGAGGTCCGAAGATCCCCCGCTTTCATCCGTAGATCGTATGCGGT  
ATTAATCCGGCTTTCGCCGGGCTATCCCCACTACAGGACATGTTCCGATGTATTACTCACCCGTTCCGCACTCGCCACC  
AGACCGAAGTCCGTGCTGCCGTCGACTGC

ID: 436

*Brevundimonas*

GGTCAGCGCAGCGCCTTCGGGTAGAACCAACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCA  
CCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAACCTTCATGCCCTCGAGTTGCAGAGGACAATCCGAAGTACGACG  
ACTTTTAAGGATTAACCCTCTGTAGTCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCACCCTGTAAGGGCCATGAGGACTTGACG  
TCATCCCCACCTTCTCCGGCTTAGCACCGGCRGTCCATTAGAGTTCCCAACTAAATGATGGCAACTAATGGCGAGGGT  
TGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTCTAGTCCCC  
GAAGGGAAAGCCAGATCTCTCTGGCGGTCCAGGCATGTCAAAGGTGGTAAGGTTCTGCGCGTTGCTTTCGAATTAACC  
ACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCCTTTGAGTTTTAATCTTTCGACCCGTAATCCCCAGGCGGATTGCT  
TAATGCGTTAGCTGCGTCACCGAAATGCATGCATCCCGACAAGTACGCAATCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTA  
TCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGAGCCTCAGCGTCAGTAATGAGCCAGTGTGTGCGCTTTCGCCACTGGTGTCTT  
CCGAATATCTACGAATTTACCTCTACACTCGGAGTTCCACACACCTCTCTCATACTCAAGACACCCAGTATCAAAGGC  
AATTCCGAGGTTGAGCCCCGGGATTTACCCCTGACTTAAATGTCCGCCTACGCTCCCTTTACGCCAGTAATTCCGAGC  
AACGCTAGCCCCCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGGGGCTTCTTCTCCGGGTACCGTCATTATC  
GTCCCCGGTGAAAGAATTTTACAATCCTAAGACCTTCATCATTCACGCGGCATGGCTGCGTCAGGCTTTCGCCATTGCG  
CAAGATTTCCCCTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCTGATCATCCTCTCAGACCAG  
CTACTGATCGTCGCCTTGGTGAGCCTTACCTACCAACTAGCTAATCAGACGCGGGCCGCTCTAAAGGCGATAAATCT  
TTCCCCGAAGGGCACATTCGGTATTAGCACAAAGTTTCCCTGAGTTATTCCGAACCTAAAGGCACGTTCCACGTTTAC  
TCACCCGTCCGCACTAACTCCGAAGAGTTCGTGACTGCA

ID: 439

*Enterobacter*

GCTACCTACTTCTTTTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGTAGC

ATTCTGATCTACGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGGAGTCGAGTTGCAGACTCCGATCCGGACTACGACATACTTTGT  
GAGGTCCGCTTGCTCTCGCGAGGTCGCTTCTCTTTGTATATGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCA  
TGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCAGTTTATCACTGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCGGCCGAACCGCTGGCAA  
CAAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATTTACAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACC  
TGTCTCAGAGTTCCCGAAGGCACCAAAGCATCTCTGCTAAGTTCTCTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTTCGCGTT  
GCATCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTACTC  
CCCAGGCGGTTCGACTTAACGCGTTAGCTCCGGAAGCCACTCCTCAAGGGAACAACCTCCAAGTCGACATCGTTTACGGC  
GTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCCACGCTTTCGCACCTGAGCGTCAGTCTTTGTCCAGGGGGCCGCT  
TCGCCACCGGTATTCCTCCAGATCTCTACGCATTTACCGCTACACCTGGAATTCTACCCCCCTCTACAAGACTCTAGCC  
TGCCAGTTTCGAATGCAGTTCCCAGGTTGAGCCCCGGGGATTTACATCCGACTTGACAGACCGCCTGCGTGCGCTTTAC  
GCCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGCACCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGTGCTTCTTCTGCG  
AGTAACGTCAATCACTGCGGTTATTAACCACAATGCCTTCCTCCTCGCTGAAAGTACTTTACAACCCGAAGGCCTTCTTC  
ATACACGCGGCATGGCTGCATCAGGCTTGCGCCCATTTGTGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACC  
GTGTCTCAGTTCCAGTGTGGCTGGTCATCCTCTCAGACCAGCTAGGGATCGTCGCCTAGGTGAGCCATTACCCACCTAC  
TAGCTAATCCCATCTGGGCACATCTGATGGCAAGAGGCCCGAAGGTCCCCCTCTTTGGTCTTGCGACGTTATGCGGTATT  
AGCTACCGTTTCCAGTAGTTATCCCCCTCCATCAGGCAGTTTCCCAGACATTACTCACCCGTCCGCCGCTCGTCACCCAG  
GAGCAAGCTCCCTGTGCTACCGCTCGACTGC

ID: 475

*Pseudomonas*

GTCCTCCGAAGGTTAGACTAGCTACTTCTGGTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGA  
ACGTATTCACCGCGACATTCTGATTCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGG  
ACTACGATCGGTTTTGTGGGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCTCTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGC  
CCAGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTTGTCACCGGCAGTCTCCTTAGAGTGCC  
ACCATAACGTGCTGGTAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGAC  
GACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAATGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCATTGGATGTCAAGGCCTG  
GTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTA  
ACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTCAACTTAATGCGTTAGCTGCGCCACTAAGAGCTCAAGGCTCCCAASGGCTAG  
TTGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGTGTCAGTATC  
AGTCCAGGTGGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTTCCTATATCTACGCATTTACCGCTACACAGGAAATTCACCACCC  
TCTACCATACTCTAGCTTGCCAGTTTTGGATGCAGTTCCAGGTTGAGCCCGGGGATTTACATCCAACCTTAACAAACCA  
CCTACGCGCGCTTACGCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGCACCCTCTGTATTACCGCGGCTGCTGGCACAGAGTTAGC  
CGGTGCTTATTCTGTCCGTAACGTCAAATTCAGAGTATTAATCTACAACCCTTCCTCCCAACTTAAAGTGCTTTACAA  
TCCGAAGACCTTCTTCACACACGCGGCATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCCATTTGTCCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCC

GTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCAGTGTGACTGATCATCCTCTCAGACCAGTTACGGATCGTCGCCTTGGTGAGC  
CATTACCTACCAACTAGCTAATCCGACCTAGGCTCATCTGATAGCGCAAGGCCCGAAGGTCCCCTGCTTTCTCCCGTAG  
GACGTATGCGGTATTAGCGTTCCTTTTCGAAACGTTGTCCCCACTACCAGGCAGATTCTAGGCATTACTACCCGTCCG  
CCGCTGAATCCAGGAGCAAGCT

ID: 490

*Bacillus*

GACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTG  
ATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAACTGAGAACGGTTTTATGAGAT  
TAGCTCCACCTCGCGGTCTTGCAGCTCTTTGTACCGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATG  
ATTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTTAATGATGGCAACTAAGA  
TCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACT  
CTGCTCCCGAAGGAGAAGCCCTATCTCTAGGGTTTTTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTTCGA  
ATTAAACCACATGCTCCACGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGCCTTGCGGCCGTAATCCCCAGGCG  
GAGTGCTTAATGCGTTAACTTCAGCACTAAAGGGGCGGAAACCYTCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACT  
ACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCCCCACGCTTTCGCGCCTCAGTGTGAGTTACAGACCAGAAAGTCGCCTTCGCCAC  
TGGTGTTCCTCCATATCTCTACGCATTTACCGCTACACATGGAATTCCACTTTCCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCAGTT  
TCCAATGACCCTCCACGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCACCTGCGCGCGCTTTACGCCAATA  
ATCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTCTGGTTAGGTACCGT  
CAAGGTGCCAGCTTATTCAACTAGCACTTGTCTTCCCTAACAAACAGAGTTTTACGACCCGAAAGCCTTCATCACTCACG  
CGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCA  
GTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTACGCATCGTTGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAAT  
GCGACGCGGGTCCATCCATAAGTGACAGCCGAAGCCGCCTTTCGAATTTTCGAACCATGCAGTTCAAATGTTATCCGGTA  
TTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCAGTCTTATGGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCTAACTTCA  
TAAGAGCAAGCTCTTAATCCATTGCTCGACTGC

ID: 494

*Bacillus*

ACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCG  
GCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACTGAGAACAGATT  
TGTGGGATTGGCTTAACCTCGCGGTTTCGCTGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGG  
GCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGC  
AACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCA  
CCTGTCACTCTGCCCGAAGGGGACGTCCTATCTCTAGGATTGTGACAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCG

TTGCTTCGAATTA AACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGACCGTAC  
TCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGGAAACCCCYTAACACTTAGCACTCATCGTTTAC  
GGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTCGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTC  
GCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTACCGCTACACGTGGAATTCCACTCTCCTCTTCTGCACTCAA  
GTTCCCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGAGCCCTTT  
ACGCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGT  
TAGGTACCGTCAAGGTACCGCCCTATTCGAACGGTACTTGTTCCTTCCCTAACAACAGAGCTTTACGATCCGAAAACCTTC  
ATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGG  
CCGTGTCTCAGTCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTACGCATCGTTGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCA  
ACTAGCTAATGCGCCGCGGGTCCATCTGTAAGTGGTAGCCGAAGCCACCTTTTATGTTTGAACCATGCGGTTCAAACAA  
CCATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCAGTCTTACAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCC  
GCTAACATCAGGGAGCAAGCTCCCATC

ID: 499

*Stenotrophomonas*

GCTACCTGCTTCTGGTGTGCAACAACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCAGC  
AATGCTGATCTGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTGAGATGGGGTTT  
CTGGGATTGGCTTACCGTCGCCGGCTTGCAGCCCTCTGTCCCCACCATTGTAGTACGTGTGTAGCCCTGGCCGTAAGGGC  
CATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCCTCCGGTTTGTACCCGGCGGTCTCCTTAGAGTTCCCACCATTACGTGCTGG  
CAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGC  
ACCTGTGTTTCGAGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCTCGACATGTCAAGGCCAGGTAAGGTTCTTCGC  
GTTGCATCGAATTA AACCACATACTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGACCGTA  
CTCCCCAGGCGGGCAACTTAACGCGTTAGCTTCGATACTGCGTGCCAAATTGCACCCAACATCCAGTTCGCATCGTTTA  
GGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGTGCCTCAGTGTGAGTGTGGTCCAGGTAGCT  
GCCTTCGCCATGGATGTTCCCTCCCGATCTCTACGCATTTCACTGCTACACCGGGAATTCGGCTACCCTCTACCACACTCT  
AGTCGTCCAGTTTCCACTGCAGTTCCAGGTTGAGCCCAGGGCTTTCACAACAGACTTAACAACACCTACGCACGCT  
TTACGCCAGTAATTCCGAGTAACGCTTGCACCCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGGTGCTTATTC  
TTTGGGTACCGTCATCCAACAGGATTAGCCGGCTGGATTTCTTTCCCAACAAAAGGGCTTTACAACCCGAAGGCCTT  
CTTACCCACGCGGTATGGCTGGATCAGGCTTGCGCCATTGTCCAATATCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGG  
ACCGTGTCTCAGTTCCAGTGTGGCTGATCATCCTCTCAGACCAGCTACGGATCGTCGCCTTGGTGGGCCTTTACCCCGCC  
AACTAGCTAATCCGACATCGGCTCATTCAATCGCGCAAGGCCCGAAGGTCCCCTGCTTTCACCCGTAGGTTCGTATGCGG  
TATTAGCGTAAGTTTCCCTACGTTATCCCCACGAAAAGTAGATTCCGATGTATTCTCACCCGTCCGCCACTCGCCAC  
CCAAGGAGCAAGCTCCTCTGTGCTGCCGTCGACTGC

ID: 503

*Serratia*

CTACCTACTTCTTTTGGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGTAGCA  
TTCTGATCTACGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGGAGTCGAGTTGCAGACTCCGATCCGGACTACGACATACTTTATG  
AGGTCCGCTTGCTCTCGCGAGTTCGCTTCTCTTTGTATATGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCAT  
GATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCCTCCGGTTTATCACCGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCGCCATCACGCGCTGGCAA  
CAAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATTTACAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACC  
TGTCTCACAGTTCCCGAAGGCACCAATCCATYTTCTGGAAAGTTCTGTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTTCGCGTT  
GCATCGAATTAACCACATGYTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGGCCGTACTC  
CCCAGGGCGGTGACTTAACGCGTTAGCTCCGGAAGCCACGCCTCAAGGGCACAACCTCCAAGTCGACATCGTTTACAGC  
GTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTGAGCGTCAGTCTTTGTCCAGGGGGCCGCCT  
TCGCCACCGGTATTCCTCCAGATCTCTACGCATTTACCGCTACACCTGGAATTCTACCCCCCTCTACAAGACTCTAGCT  
TGCCAGTTTCAAATGCAGTTCCCAAGTTAAGCTCGGGGATTTACATCTGACTTAACAAACCGCCTGCGTGCCTTTACG  
CCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGCACCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGTGCTTCTTCTGCGA  
GTAACGTCAATGAACGGTGCTATTAACACCGAACCCTTCTCCTCGCTGAAAGTGCTTTACAACCCGAAGGCCTTCTTCA  
CACACGCGGCATGGCTGCATCAGGCTTGCGCCCATTTGTGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCG  
TGTCTCAGTTCAGTGTGGCTGGTCATCCTCTCAGACCAGCTAGGGATCGTCGCCTAGGTGAGCCATTACCTCACCTACT  
AGCTAATCCCATCTGGGCACATCCGATGGTGTGAGGCCCCGAAGGTCCCCCACTTTGGTCCGAAGACGTTATGCGGTATT  
AGCTACCGTTTCCAGTAGTTATCCCCCTCCATCGGGCAGTTTCCAGACATACTCACCCGTCCGCCGCTCGTCACCCAG  
GAGCAAGCTCCTTGTGCTACCGCTCGACTGCA

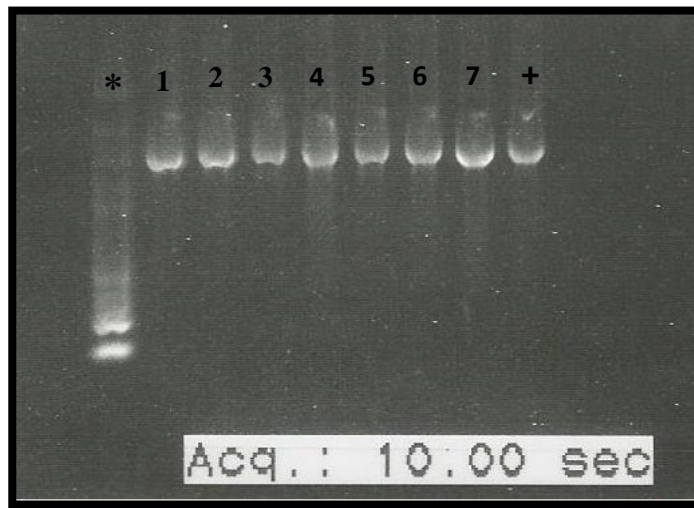
ID: 511

*Chryseobacterium*

GTTACGGTCACCGACTTCAGGTACCCCAGACTTCCATGGCTTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCAC  
CGCGCCATGGCTGATGCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCATAGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGAACTGAGACC  
AGCTTTCGAGATTAGCATCCAGTCGCTGGTAGCAGCCCTCTGTACTGGCCATTGTATTACGTGTGTGGCCCAAGGCGTA  
AGGGCCGTGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCCTCTACTTGCCTAGGCAGTCTACTAGAGTCCCCAACTGAATGA  
TGGCAACTAGTGACAGGGGTTGCGCTCGTTGCAGGACTTAACCTAACACCTCACGGCACGAGCTGACGACAACCATGC  
AGCACCTTGAAAAATGTCCGAAGAAAAGTCTATTTCTAAACCTGTCATTTCCCATTTAAGCCTTGGAAGGTTCCCTCGCG  
TATCATCGAATTAACCACATAATCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCATTCTTGCGAACGTAC  
TCCCCAGGTGGCTAACTTATCACTTTCGCTTAGTCTCTGAATCCGAAAACCCAAAAACGAGTTAGCATCGTTTACGGCGT  
GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTCGCTCCCCACGCTTTCGTCCATCAGCGTCAGTTAAGACATGGTAACCTGCCTTC  
GCAATTGGTGTCTAAGTAATATCTATGCATTTACCGCTACACTACTTATTCCAGCTACCTCTACCTTACTCAAGACCC  
GCAGTATCAATGGCAGTTTCATAGTTAAGCTATGAGATTTACCACTGACTTACGAGTCCGCCTACGGACCCTTTAAACC

CAATAAATCCGGATAACGCTTGCACCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGTGCTTATTCGTATAG  
TACCTTCAGCTTTCCACACGTGGAAAGGTTTATCCCTATACAAAAGAAGTTTACAACCCATAGGGCCGTCATCCTTCACG  
CGGGATGGCTGGATCAGGCTCTCACCCATTGTCCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGTCCGTGTCTCA  
GTACCAGTGTGGGGGATCACCCCTCTCAGGCCCCCTAAAGATCATTGACTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTATCTAA  
TCTTGCGCGTGCCCATCTCTATCCACCGGAGTTTTCAATATCAAATGATGCCATTCAATATATTATGGGGTATTAATCTT  
CCTTTCGAAAGGCTATCCCCCTGATAAAGGTAAGTTGCACACGTGTTCCGCACCCGTACGCCGCTCTCTCTG

*Fotografía representativa de los geles de agarosa para visualizar los productos de PCR*



CONVENCIONES

- \* Marcador de peso
- 1-7 Gen 16S amplificado de las bacterias secuenciadas
- + Control positivo



**Listado total de las especies encontradas en todos los individuos muestreados de *R. palmatus* y *D. labialis*.**

Donde el #1 indica presencia del microorganismo, el color verde que presento un efecto anti-Bd, y el color rojo que no presentó un efecto anti-Bd.

Especie	<i>R. palmatus</i>															<i>D. labialis</i>								
	A1	A2	A3	A4	A5	J1	J2	J3	J4	J5	R1	R2	R3	R4	R5	A1	A2	A3	A4	A5	J1	R1	R2	R3
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>															1									
<i>Acinetobacter guillouiae</i>																	1							
<i>Acinetobacter haemolyticus</i>				1																				
<i>Acinetobacter johnsonii</i>																							1	
<i>Acinetobacter junii</i>				1																				
<i>Aeromicrobium sp.</i>											1													
<i>Aeromonas hydrophila</i>								1			1	1		1									1	
<i>Aeromonas jandaei</i>											1													
<i>Arthrobacter gandavensis</i>							1	1	1		1			1										
<i>Arthrobacter koreensis</i>									1															
<i>Arthrobacter oxydans</i>			1		1					1														
<i>Arthrobacter pascens</i>						1				1														
<i>Arthrobacter polychromogenes</i>				1		1																		
<i>Bacillus cereus</i>					1								1	1	1					1	1	1	1	1
<i>Bacillus circulans</i>																				1	1			
<i>Bacillus megaterium</i>					1							1												
<i>Bacillus simplex</i>																		1						
<i>Bacillus sonorensis</i>		1																						
<i>Bacillus sp.</i>																						1	1	
<i>Bacillus subtilis</i>					1					1	1	1		1				1	1		1			
<i>Brevundimonas sp.</i>																				1				
<i>Brevundimonas vesicularis</i>										1										1	1		1	
<i>Burkholderia sp.</i>																				1				

<i>Chromobacterium sp.</i>									1										
<i>Chryseobacterium hagamense</i>																			1
<i>Chryseobacterium indologenes</i>						1													
<i>Chryseobacterium joostei</i>				1			1					1	1						1
<i>Chryseobacterium sp.</i>	1	1	1	1			1						1						
<i>Citrobacter freundii</i>		1	1															1	
<i>Citrobacter koseri</i>				1					1	1									
<i>Comamonas sp.</i>									1										
<i>Cronobacter sakazakii</i>																			
<i>Curtobacterium albidum</i>														1					
<i>Curtobacterium luteum</i>																			1
<i>Curtobacterium sp</i>																			1
<i>Delftia acidovorans</i>																			1
<i>Dermacoccus sp</i>																			
<i>Enterobacter amnigenus</i>																			
<i>Enterobacter asburiae</i>																			
<i>Enterobacter cloacae</i>																			
<i>Enterobacter cowanii</i>																			
<i>Ewingella americana</i>																			
<i>Herbaspirillum huttiense</i>																			
<i>Janthinobacterium lividum</i>																			
<i>Klebsiella oxytoca</i>																			
<i>Microbacterium foliorum</i>																			
<i>Microbacterium natoriense</i>																			
<i>Microbacterium resistens</i>																			
<i>Microbacterium sp.</i>																			
<i>Micrococcus luteus</i>																			
<i>Pantoea agglomerans</i>																			
<i>Pantoea ananatis</i>																			
<i>Pseudomonas abietaniphila</i>																			

<i>Pseudomonas antarctica</i>																1													
<i>Pseudomonas azotoformans</i>																		1											
<i>Pseudomonas brassicacearum</i>										1	1	1								1									
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>			1		1		1			1	1	1	1	1				1		1		1							
<i>Pseudomonas corrugata</i>			1					1		1	1	1	1					1				1							
<i>Pseudomonas fluorescens</i>							1			1																			
<i>Pseudomonas fuscovaginae</i>																						1							
<i>Pseudomonas gessardii</i>																						1							
<i>Pseudomonas jessenii</i>	1																				1								
<i>Pseudomonas kilonensis</i>																						1	1						
<i>Pseudomonas koreensis</i>						1	1	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1					1	1	1	1	1	1	1
<i>Pseudomonas orientalis</i>																													
<i>Pseudomonas putida</i>			1							1				1															
<i>Pseudomonas sp</i>									1																		1		
<i>Pseudomonas tolaasii</i>																													
<i>Pseudomonas vancouverensis</i>																													
<i>Rahnella aquatilis</i>																													
<i>Raoultella ornithinolytica</i>						1				1		1	1	1														1	
<i>Raoultella terrigena</i>	1	1									1	1	1																
<i>Rhodococcus erythropolis</i>																													1
<i>Serratia fonticola</i>																													1
<i>Serratia liquefaciens</i>																													1
<i>Serratia sp.</i>																													1
<i>Sphingobacterium multivorum</i>																													1
<i>Sphingomonas aerolata</i>																													1
<i>Sphingomonas trueperi</i>																													1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>																													1
<i>Staphylococcus sciuri</i>																													1
<i>Stenotrophomonas ehizophila</i>																													1
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>																													1

<i>Stenotrophomonas sp.</i>				1																1
<i>Variovorax sp.</i>											1		1							
<i>Vogesella sp.</i>									1											