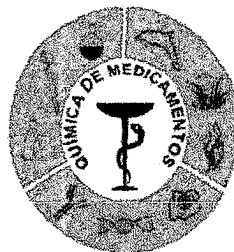




Universidad de Los Andes
Facultad de Farmacia y Bioanálisis
Postgrado en Química de Medicamentos.



QR105
F5

**AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y DETECCIÓN DE MICROORGANISMOS,
CON ACTIVIDADES BIOLÓGICAS, PROCEDENTES DE LAS AGUAS DE LOS
MANANTIALES TERMALES LA MITISÚS Y SANTA APOLONIA DEL ESTADO
MÉRIDA**

Autora: Lic. Sandra Flores.

Tutor: Dr. Félix Andueza.

Mérida, Enero 2014

A mi esposo

www.bdigital.ula.ve

Agradecimientos

A dios padre por darme salud, fuerza y voluntad para alcanzar esta meta.

A mi esposo Carlos por ser mi apoyo, mi compañero, mi guía, la mano que siempre me levanto cada vez que decaía. Gracias simplemente por estar a mi lado.

A mis padres por su paciencia, comprensión y apoyo en esos días difíciles, gracias por sus consejos y palabras de aliento.

Al profesor Félix Andueza por brindarme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación, por instruirme y capacitarme en un área totalmente nueva para mí.

A la profesora Judith Araque por ser pilar fundamental en el desarrollo del trabajo en el laboratorio, por su dedicación, paciencia y comprensión.

A la profesora Maria Alejandra Blanco por su dedicación y colaboración.

A la profesora Angela Lugo por sus consejos y recomendaciones.

A mis familiares y amigos que de alguna u otra manera contribuyeron para que hoy este sueño se vea cristalizado.

A todos mis mas sinceros agradecimientos.

Índice de contenido

	Pg.
Introducción.....	1
CAPÍTULO 1. Bases teóricas.	4
1. Bases teóricas.....	5
1.1. Aguas termales o manantial termal	5
1.2. Origen de las aguas termales.....	5
1.3. Clasificación de las aguas termales	6
1.4. Características fisicoquímicas de las aguas termales:.....	7
1.4.1. Temperatura.....	7
1.4.2. Composición.....	8
1.4.3. Conductividad eléctrica	8
1.4.4. Turbidez y transparencia.	9
1.4.5. Radiactividad.....	9
1.5. Características microbiológicas de las aguas termales.	9
1.5.1. Microorganismos autóctonos.....	10
1.5.2. Género <i>Pseudomonas</i>	11
1.5.2.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11
1.5.2.2. <i>Pseudomonas fluorescens</i>	12
1.5.2.3. <i>Pseudomonas stutzeri</i>	12
1.5.3. Género <i>Ralstonia</i>	12
1.5.4. Género <i>Burkholderia</i>	13
1.5.5. Género <i>Comamonas</i>	14
1.5.6. Género <i>Shewanella</i>	14
1.5.7. Género <i>Staphylococcus</i>	15
1.6. Microorganismos que viven a elevada temperatura	16
1.7. Adaptaciones de los microorganismos que viven a elevadas temperaturas.....	17
1.8. Actividad biológica y enzimática de los microorganismos que viven a elevadas temperaturas.....	18
1.8.1. Antibióticos.....	18
1.8.2. Bioconversión microbiana	18
1.8.3. Ácidos orgánicos.....	19

1.8.4. Bioinsecticidas	19
1.8.5. Biopolímeros	19
1.8.6. Biosurfactantes	20
1.8.7. Aminoácidos y vitaminas	20
1.8.8. Enzimas	20
1.9. Aplicaciones farmacéuticas y biotecnológicas de microorganismos que viven a elevadas temperaturas	22
1.10. Antecedentes de investigaciones en manantiales de aguas termales en Venezuela y el estado Mérida.	23
CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES DE LA HIPÓTESIS, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	26
2. Antecedentes de la hipótesis	27
2.2. Objetivo general	30
2.3. Objetivos específicos	30
CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA	31
3. Población de estudio y locación de muestreo.	32
3.1. Ubicación de la fuente termal La Mitisús.	32
3.2. Ubicación de la fuente termal Santa Apolonia	32
3.3. Metodología	32
3.3.1. Toma de muestras	32
3.3.2. Determinación pH temperatura	32
3.3.3. Métodos para el análisis microbiológico de las aguas termales La Mitisús y Santa Apolonia.	35
3.3.3.1. Aislamiento de bacterias heterótrofas viables aerobias mesófilas. ...	35
3.3.3.2. Identificación de bacterias heterótrofas viables aerobias mesófilas.	36
3.3.3.3. Determinación de la actividad antimicrobiana y antifúngica de las bacterias heterótrofas viables mesófilas aisladas	42
3.3.3.4. Detección de microorganismos con actividades enzimáticas: amilolíticas, proteolíticas, celulolíticas amonificantes, y lipolíticas.	43
3.3.3.5. Prueba de susceptibilidad a los antibióticos	44
CAPÍTULO 4. RESULTADOS	46
4.1. Determinación temperatura y pH	47
4.2. Análisis microbiológico de las aguas termales La Mitisús y Santa Apolonia	48
4.2.1. Aislamiento de bacterias heterótrofas viables aerobias mesófilas.	48

4.2.2. Identificación de bacterias heterótrofas viables aerobias mesófilas aisladas en las aguas de los manantiales termales de Santa Apolonia y La Mitisús, estado Mérida.	50
4.2.3. Determinación de la actividad antimicrobiana y antifúngica de las bacterias heterótrofas viables mesófilas aisladas del agua de los manantiales termales de Santa Apolonia y La Mitisús, estado Mérida.	63
4.2.4. Detección de microorganismos con actividades enzimáticas: amilolíticas, proteolíticas, celulolíticas, amonificantes, y lipolíticas en muestra de agua de los manantiales termales de Santa Apolonia y La Mitisús, estado Mérida, estado Mérida.	65
4.2.5. Susceptibilidad a los antibióticos	68
CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	70
5. Análisis y discusión.....	71
5.1. Determinación de temperatura y pH.....	71
5.2. Análisis microbiológico de las aguas termales La Mitisús y Santa Apolonia, estado Mérida.	74
5.2.1. Aislamiento e identificación de bacterias heterótrofas viables aerobias mesófilas.	74
5.2.2. Determinación de la actividad antimicrobiana y antifúngica de las bacterias heterótrofas viables mesófilas aisladas e identificadas procedentes del agua de los manantiales termales de Santa Apolonia y La Mitisús, estado Mérida.	98
5.2.3. Actividades enzimáticas de las especies bacterianas aisladas del agua de los manantiales termales de Santa Apolonia y La Mitisús, estado Mérida.	103
5.2.4. Perfil de susceptibilidad a los antibióticos de las cepas bacterianas identificadas procedentes de las aguas de los manantiales termales de Santa Apolonia y La Mitisús, estado Mérida.	105
Conclusiones	109
Recomendaciones	112
Bibliografía	113
Anexos	133

Índice de figuras

	Pg.
1. Formación de una manantial termal.....	6
2. Mapa de las aguas termales del estado Mérida.....	34
3. Distribución porcentual de colonias bacterianas aisladas en el agua de los manantiales termales de Santa Apolonia y La Mitisús, estado Mérida.....	50
4. Distribución Porcentual de bacterias Gram negativas y Gram positivas presentes en el agua del manantial termal de Santa Apolonia, estado Mérida.....	52
5. Distribución Porcentual de bacterias Gram negativas y Gram positivas presentes en el agua del manantial termal de La Mitisús, estado Mérida.....	52
6. Distribución porcentual de géneros bacterianos identificados en el agua del manantial termal de Santa Apolonia, estado Mérida.....	59
7. Distribución porcentual de géneros bacterianos identificados en el agua del manantial termal de La Mitisús, estado Mérida.....	59
8. Distribución porcentual de las especies bacterianas identificadas presentes en el agua del manantial termal de Santa Apolonia, estado Mérida.....	62
9. Distribución porcentual de las especies bacterianas identificadas presentes en el agua del manantial termal de La Mitisús, estado Mérida.....	62
10. Efecto antagónico <i>Pseudomonas fluorescens</i> cepa MA-PC contra <i>Escherichia coli</i> ATCC25922.....	135
11. Efecto antagónico <i>Pseudomonas aeruginosa</i> cepa MA-PC/C contra <i>Escherichia coli</i> ATCC25922.....	135
12. Efecto antagónico <i>Pseudomonas aeruginosa</i> cepa MA-PC/C contra <i>Escherichia coli</i> ATCC25922.....	135
13. Efecto antagónico <i>Pseudomonas fluorescens</i> cepa MA-PC contra <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923.....	136
14. Efecto antagónico <i>Pseudomonas aeruginosa</i> cepa MA-PC/C contra <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923.....	136
15. Efecto antagónico <i>Pseudomonas aeruginosa</i> cepa MA-PC/C contra <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC29213.....	136
16. Efecto antagónico <i>Pseudomonas fluorescens</i> cepa MA-PC contra <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC23352.....	137
17. Efecto antagónico <i>Pseudomonas aeruginosa</i> cepa MA-PC/C contra <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC2335.....	137

AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y DETECCIÓN DE MICROORGANISMOS, CON ACTIVIDADES BIOLÓGICAS, PROCEDENTES DE LAS AGUAS DE LOS MANANTIALES TERMALES LA MITISÚS Y SANTA APOLONIA DEL ESTADO MÉRIDA.

Sandra Flores

Resumen

Se realizó un estudio microbiológico en muestras de aguas obtenidas de los manantiales termales de Santa Apolonia y La Mitisús, con el objeto de aislar, identificar y detectar microorganismos con posibles actividades biológicas. Se logró aislar 21 cepas bacterianas, por el método de filtración de membrana y empleando diferentes medios de cultivos. La mayor parte de las cepas aisladas en ambos manantiales fueron bacterias Gram negativas. Se determinó que 18 de las cepas aisladas en ambos manantiales termales fueron bacterias Gram negativas no fermentadoras (BGNNF), por lo que fueron identificadas a nivel de género y especie, empleando el sistema de identificación comercial API® 20NE. Para el manantial termal de Santa Apolonia las especies encontradas fueron *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Burkholderia cepacia*, siendo esta última la especie de mayor frecuencia (62,5%). En cuanto al manantial termal de La Mitisús las especies halladas fueron *Ralstonia pickettii*, *Pseudomonas stutzeri*, *Shewanella putrefaciens* y *Comamonas testosteroni*, la cual fue la especie con mayor presencia (70%) en este manantial. Con respecto a las bacterias Gram positivas aisladas, específicamente cocos Gram positivos, se encontraron en baja proporción y según las pruebas bioquímicas realizados estas corresponden al género *Staphylococcus*. Empleando el método de difusión en Agar, se evaluó la capacidad antagónica de las cepas aisladas frente a diferentes cepas ATCC, observándose que las cepas pertenecientes a las especies *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas aeruginosa* obtenidas en las muestras del manantial termal de Santa Apolonia inhibieron el crecimiento del hongo filamentoso *Aspergillus niger*. También se observó que las especies *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas aeruginosa* presentaron efecto antibacteriano contra bacterias Gram negativas y Gram positivas. Adicionalmente se realizaron pruebas de actividad enzimática que reflejaron que las cepas de las especies *Burkholderia cepacia* y *Pseudomonas fluorescens*, presentaron actividad enzimática amilolítica y proteolítica. Finalmente se realizaron estudios de susceptibilidad antimicrobiana a las BGNNF por el método de Kirby Bauer, donde se observó que el 100% de las cepas aisladas fueron sensibles a la mayoría de los antibióticos utilizados. Este trabajo constituye el primer reporte del aislamiento las especies *Ralstonia pickettii*, *Shewanella putrefaciens* y *Comamonas testosteroni* en aguas termales de Venezuela.

Palabras claves: manantial termal, actividad biológica, bacterias Gram negativas no fermentadoras, *Ralstonia pickettii*, *Shewanella putrefaciens*, *Comamonas testosteroni*.

ISOLATION, IDENTIFICATION AND DETECTION OF MICROORGANISMS WITH BIOLOGICAL ACTIVITIES, FROM THE HOT SPRINGS WATERS LA MITISÚS, AND SANTA APOLONIA IN MÉRIDA STATE.

Sandra Flores

Abstract

This study is reporting a microbiological analysis of water samples obtained from the hot spring waters of Santa Apolonia and La Mitisus in order to isolate, identify and detect microorganisms with potential biological activities. Twenty one bacterial strains were isolated, using membrane filtration method and different culture media. Most of the strains isolated in both springs were Gram-negative bacteria. It was determined that 18 of the strains isolated in both hot springs were Gram-negative bacteria not fermented (NFGNB), so they were identified to the genus and species level, using the identification commercial system API® 20NE. In the thermal spring samples of Santa Apolonia the species found were *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*, the most frequent specie was *Burkholderia cepacia* (62.5%). In thermal spring of La Mitisus the species found were *Ralstonia pickettii*, *Pseudomonas stutzeri*, *Shewanella putrefaciens* and *Comamonas testosteroni*, the most frequent specie in this spring was *Comamonas testosteroni* (70%). In regards to the Gram-positive bacteria isolated, specifically Gram positive cocci, were found in low proportion and according to the biochemical tests, correspond to the genus *Staphylococcus*. The agar diffusion method was used to assess the capacity of the antagonistic strains isolated against different ATCC strains, observing *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from thermal spring of Santa Apolonia, with inhibited the growth of the filamentous fungus *Aspergillus niger*. The species *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas aeruginosa* presented antibacterial effect against Gram-negative and Gram-positive bacteria. Strains of the species *Burkholderia cepacia* and *Pseudomonas fluorescens* presented amylolytic and proteolytic enzymatic activity. Finally in the studie done of antimicrobial susceptibility to the NFGNB by the Kirby Bauer method, it was observed that 100% of the isolated microorganisms were sensitive to the most antibiotics used. This work constitutes the first report of isolation of *Ralstonia pickettii*, *Shewanella putrefaciens* and *Comamonas testosteroni* in hot spring waters of Venezuela.

Key Words: hot spring waters, biological activity, Gram-negative bacteria not fermenting, *Ralstonia picketti*, *Shewanella putrefaciens*, *Comamonas testosteroni*.

Introducción

Los manantiales de aguas termales son hábitats extremos ya que tienen altas temperaturas y elevadas concentraciones de sales, condiciones desfavorables para la vida de muchos seres vivos. Sin embargo, desde hace tiempo se conoce que estas aguas, como cualquier ambiente acuático natural poseen una población microbiana autóctona que suele ser característica de cada tipo de manantial y que depende de sus propiedades fisicoquímicas (temperatura, pH y composición mineral)^{1,2}.

En la actualidad existe un creciente interés por el estudio de la biodiversidad de los ambientes extremos, con el fin de determinar cuáles son las características peculiares que permiten a estos microorganismos sobrevivir en él y qué papel tienen en los ciclos de la naturaleza^{1,2}.

Adicional a ello en los últimos años alrededor del mundo, en países como Tailandia, India, Egipto, Irán, Jordania, Argentina, Colombia entre otros, se ha incrementado el interés por los análisis microbiológicos, ya que algunos de los microorganismos que habitan en estos ambientes extremos se les han descubierto aplicaciones en la industria farmacéutica y biotecnológica, debido a que los metabolitos primarios y secundarios producidos por ellos presentan diversas actividades biológicas y enzimáticas³, muchas de las cuales han sido utilizadas en la medicina para luchar contra diversas enfermedades, como el cáncer, trastornos del sistema inmunológico e infecciones microbianas entre otros^{4,5,6,7,8,9}.

De igual forma, algunos de los microorganismos aislados de aguas de manantiales termales, han sido fuente de compuestos químicos con aplicaciones en otros sectores industriales como la industria del papel, cuero, hidrocarburos, textil, alimentos y en procesos de bioremediación ambiental^{10,11,12,13,14,15,16,17}.

Otro aspecto importante de realizar estudios microbiológicos, es determinar la biodiversidad microbiana de los manantiales termales y de esta manera dar a conocer parte de los microorganismos que habitan el planeta.

Venezuela al igual que muchos países, cuenta con abundantes fuentes de aguas termales distribuidas por gran parte del territorio nacional. Se conocen más de 50 localidades en las que existen numerosas manifestaciones hidrotermales superficiales, entre estas las de los Andes venezolanos en el estado Mérida. Estos brotes están presentes en diversas formas: manantiales de agua caliente, hervideros de lodo, emanaciones de vapor de agua y otros gases en su mayoría sulfurados; las temperaturas son notablemente elevadas y generalmente están por encima de las temperaturas medias locales en un mínimo de 5°C a 6°C, rango suficiente para ser consideradas anómalas; llegando incluso a temperaturas en la superficie de más de 90°C¹⁸. A pesar de contar con un gran número de afluentes termales en nuestro país, son pocos los trabajos realizados para conocer la biodiversidad microbiana, las posibles actividades biológicas y enzimáticas que puedan tener los microorganismos aislados en ambientes termales, este sería uno de los primeros trabajos realizados en la región Andina con respecto a este tema.

Tomando en consideración lo antes señalado, el principal propósito en este trabajo fue aislar, identificar y detectar, microorganismos que habitan en las aguas termales del estado Mérida, en las localidades de La Mitisús y Santa Apolonia, con la finalidad de determinar la presencia de microorganismos con posibles actividades biológicas antimicrobianas, fúngicas y enzimáticas importantes desde un punto de vista farmacéutico y biotecnológico.

El aislamiento e identificación de los microorganismos que habitan en los manantiales termales de Santa Apolonia y La Mitisús, se realizó por medio del método de filtración de membrana, sembrado los filtros en placa con diferentes agares para la obtención de cultivos puros. A las colonias aisladas se les realizaron pruebas bioquímicas y para determinar la identidad de la mayoría de los aislados se utilizó las pruebas comerciales API[®].

Se evaluó la capacidad antagónica de las cepas aisladas de los manantiales termales frente a diferentes cepas ATCC por el método de difusión en agar. Debido a la resistencia a los antibióticos existente por parte de los diferentes patógenos, es importante realizar estudios que permitan encontrar nuevos

compuestos que pudieran ser utilizadas, a mediano y largo plazo, contra estos microorganismos.

A los aislados también se les determinó la capacidad de producir enzimas proteolíticas, amilolíticas, celulolíticas, lipolíticas y amonificantes, empleando diferentes medios. La importancia de detectar estas actividades enzimáticas radica en que las enzimas generadas por microorganismos aislados de ambientes termales, catalizan reacciones que se llevan a cabo a altas temperaturas, incrementando de esta manera el rendimiento de los procesos industriales y disminuyendo el costo de producción; por lo tanto los microorganismo aislados en éste tipo de ambientes termales pueden tener aplicaciones a nivel industrial.

Adicionalmente, se realizaron pruebas de susceptibilidad a diferentes antibióticos de las cepas aisladas, empleando el método de Kirby Bauer de difusión en agar.

En vista que los manantiales termales son empleadas generalmente para fines recreacionales y terapéuticos, estas aguas son usadas por niños, ancianos y personas con problemas médicos, los cuales son vulnerables a los diferentes microorganismos que viven en estos habitats. Por lo tanto es importante realizar estudios que permitan determinar fenotipos de resistencia a los antibióticos.

CAPÍTULO 1.

BASES TÉORICAS

www.bdigital.ula.ve

1. Bases teóricas

1.1. Aguas termales o manantial termal

En función de parámetros como la temperatura y minerales disueltos, se puede encontrar diversas definiciones de aguas termales. Una de ellas es que las aguas termales son fuentes subterráneas que en su punto de emergencia poseen una temperatura mayor que la temperatura media anual local¹⁹. Otros autores definen manantial termal cuando la temperatura es de al menos 5°C más alta que la temperatura media anual de lugar²⁰.

Diversos calificativos son utilizados para referirse a las aguas termales:

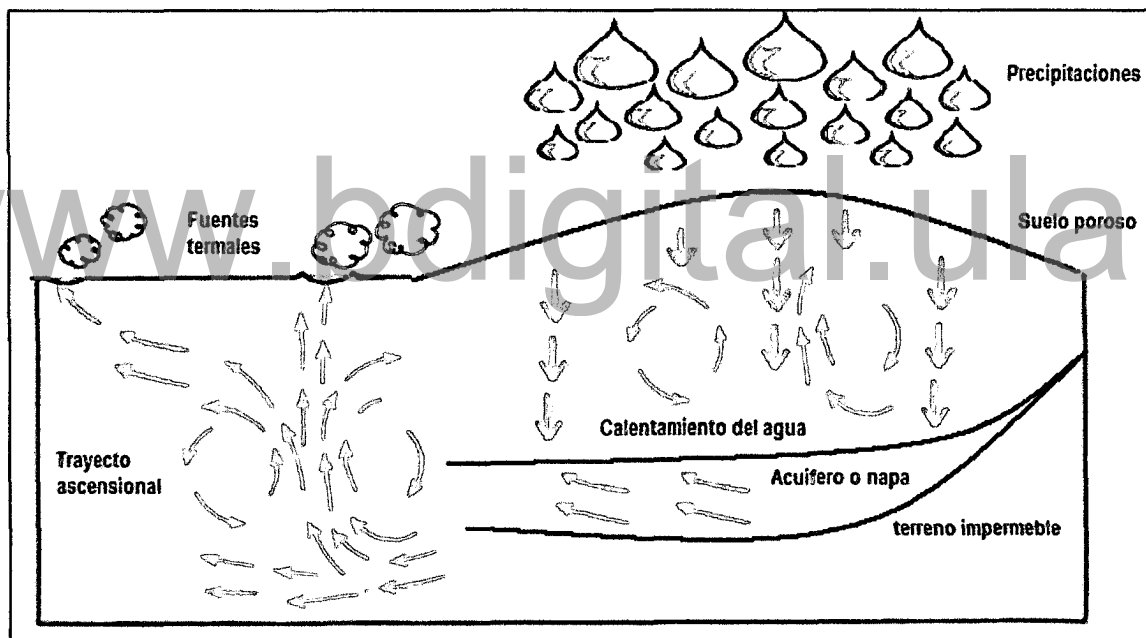
- Aguas minerales: son aquellas que poseen un contenido de por lo menos 1 g de sustancia mineral por cada litro de agua²¹.
- Agua termominera: son agua subterránea que en su punto de emergencia tiene una temperatura superior a la media anual local y contienen un total de sólidos disueltos superior a un 1 g/L²⁰.
- Aguas mineromedicinales: estas tienen un contenido de sales disueltas que les confiere propiedades terapéuticas, para el tratamiento de diferentes enfermedades²².

Para los fines de este estudio se considerara que una fuente de agua termal, es aquella que contiene en su composición elementos químicos y sales minerales en valores superiores a los que normalmente se encuentran en el agua subterránea y que posee una temperatura por lo menos 5°C más alta que la temperatura media anual del lugar en el que emerge^{18,19}.

1.2. Origen de las aguas termales

Las aguas termales son el resultado de la infiltración pura y sencilla de las aguas meteorológicas²³. Una vez en subsuelo las aguas descienden por medio de

grandes fracturas en el subsuelo debido al efecto gravitacional hasta que la presencia de una capa impermeable lo impida, quedando almacenada formando un acuífero o napa²¹. En la circulación descendiente el agua se calienta por efecto del gradiente geotérmico. Las temperaturas y presiones elevadas a las que es sometida el agua ocasionan el escurrimiento y precipitación de minerales específicos de las rocas que lava^{21,23}. Gracias al paso de agua fría y en algunos casos debido al efecto expansivo de los vapores formados, el agua imprime un trayecto ascensional de regreso hacia la superficie por otras vías que no son las del descenso²³, en este proceso el agua encuentran escapatorias por las aberturas (fallas) donde afloran a la superficie produciendo un escape natural de agua, lo que constituye un manantial termal²¹.



Fuente http://www.redes-geopalea.org/ciencias1/geologia/islandia/geologia_islandia_gestivellir.htm

Figura. 1 Formación de una manantial termal.

1.3. Clasificación de las aguas termales

El criterio de clasificación de las aguas termales puede ser asumido desde diversos puntos de vista entre estos: la temperatura y la composición química²¹.

De acuerdo a su temperatura estas se clasifican en:

- ✓ Hipertermal (50°C a 100°C)
- ✓ Mesotermal (35°C a 45°C).
- ✓ Hipotermal (20°C a 35°C).
- ✓ Protermal (15°C a 25°C)²¹.

De acuerdo a su composición mineral estas se clasifican como:

- ✓ Oligominerales su contenido mineral no supera 100 mg/L.
- ✓ Mineralización muy débil concentración de minerales entre 100 y 250 mg/L.
- ✓ Mineralización débil concentración de minerales entre 250 y 500 mg/L.
- ✓ Mineralización media concentración de minerales entre 500 y 1000 mg/L
- ✓ Mineralización fuerte su contenido mineral es superior a 1000 mg/L²³.

1.4. Características fisicoquímicas de las aguas termales:

1.4.1. Temperatura.

Las aguas subterráneas gozan por lo general de constancia en la temperatura. En las aguas de capas (porosidad primaria) se tienen temperaturas que varían mucho con la extensión y penetración de la capa en el suelo. Si no hay influencia térmica de aguas superficiales, un agua de capa que circule muy lentamente por un estrato impermeable situado a 100 m de profundidad poseerá una temperatura superior en dos o tres grados a otra que se encuentre en un terreno compacto situado solamente a 30 m abajo de la superficie, según la ley del gradiente geotérmico²⁴.

En promedio por cada dos grados de latitud que nos alejemos del ecuador la temperatura disminuye 1°C y por cada 150 m en altitud, la variación de la temperatura es de 1°C²⁴.

1.4.2. Composición.

Desde el punto de vista químico cada fuente tiene una composición que depende de la constitución de las zonas subterráneas atravesadas, que le cede o con las que ha intercambiado sustancias²⁴.

Las sales alcalinas son muy frecuentes, el cloruro de sodio se encuentra casi siempre. El carbonato de calcio, el sulfato de calcio es el elemento mineral más importante en estas aguas. La dureza del agua por la presencia de sales alcalinotérreas, como las de calcio y magnesio, se modifica en las diferentes regiones. Pero se puede distinguir la dureza temporal de la permanente, explicada la primera por la presencia de carbonatos y la segunda por sulfatos²⁵.

El hierro existe a menudo en las aguas subterráneas pero es inestable bajo la forma de bicarbonato ferroso²⁵. El manganeso sigue de cerca al hierro, eliminándose con menor facilidad. El plomo y los nitratos no son frecuentes en aguas subterráneas, indican habitualmente contaminación²⁵.

1.4.3. Conductividad eléctrica

Como consecuencia de su contenido iónico, el agua se hace conductora de la electricidad. A medida que la concentración iónica aumenta, aumenta también hasta cierto límite la conductividad (C) o capacidad de un agua para conducir la corriente eléctrica. En aguas subterráneas los valores de conductividad varían considerablemente²⁶, debido a que estas circulan por la corteza terrestre comportándose como un solvente natural, complejo y dinámico; donde participa en los procesos de disolución de minerales, intercambio iónico, transporte de minerales, en reacciones químicas, transferencia de calor, gases y elementos químicos. Generalmente los valores de conductividad en aguas subterráneas dulces oscilan entre 100 y 2000 $\mu\text{S}/\text{cm}$, sin embargo la conductividad en este tipo de aguas dependerá de cada lugar^{24,27}

1.4.4. Turbidez y transparencia.

Estas propiedades de las aguas de circulación varían en muchas ocasiones con su caudal. Las aguas de capas, contrariamente permanecen transparentes casi siempre por la filtración del sistema. Las de calizas presentan características intermedias entre las aguas de circulación y las de capas, dependiendo de la evolución del terreno calcáreo. El color por regla general, es débil, salvo cuando están cargadas con sales de hierro²⁴.

1.4.5. Radiactividad.

Las aguas termales poseen una pequeña cantidad de núcleidos radiactivos procedentes de la lixiviación y arrastre de los radionúcleidos naturales que existen en los terrenos que las aguas atraviesan durante su recorrido a través de las capas freáticas²⁸. Los isótopos radiactivos que habitualmente se encuentran presentes en aguas termales son Radon-222, Uranio-238, Uranio-235 y Torio-232, que se encuentran distribuidos abundantemente, aunque de forma desigual, en la corteza terrestre²⁷.

1.5. Características microbiológicas de las aguas termales.

La diversidad de las especies que existen en un determinado hábitat es una consecuencia de la relación entre los organismos y el ambiente².

Las aguas termales son hábitats extremos ya que tienen altas temperaturas y elevadas concentraciones de sales, condiciones desfavorables para la vida de muchos seres vivos. Sin embargo, desde hace tiempo se conoce que estas aguas minerales, como cualquier ambiente acuático natural, poseen una población microbiana autóctona que suele ser característica de cada tipo de agua y que depende de sus propiedades fisicoquímicas (temperatura, pH, sales minerales, nutrientes), se sabe también que en ellas pueden encontrar otros microorganismos llamados alóctonos^{2,29}.

1.5.1. Microorganismos autóctonos

Según los requerimientos nutricionales en aguas termales predominan las bacterias heterótrofas oligotróficas, que tienen escasos requerimientos de carbono y nitrógeno (oligocarbofilicas y oligonitrofilicas). Las bacterias heterótrofas no suelen fermentar azúcares, pero son proteolíticas, amilolíticas, amonificantes y en menor número celulolíticas. Estos tipos de bacterias obtienen los nutrientes necesarios de materia orgánica disponible en el medio y se consideran beneficiosas ya que intervienen en la autodepuración de las aguas si de una forma accidental sufren un aporte de materia orgánica^{27,30}. En aguas termales se pueden encontrar también, pero en menor número microorganismos autótrofos, tanto quimiolitotrofos como fototrofos (cianobacterias, bacterias verdes y rojas). La mayoría son aeróbicos o anaerobios facultativos, de pequeño tamaño, móviles y con pigmentos².

En relación a la temperatura como factor determinante para el crecimiento o inhibición de distintos tipos de microorganismos tenemos que en aguas hipergeotermos se presentan una mayor proporción de bacterias Gram positivas³⁰, mientras que en aguas hipotermos y mesotermos predominan bacilos Gram negativos y se pueden encontrar en menor proporción cocos Gram positivos. La elevada temperatura de las aguas hipergeotermos puede ser la causa de esta diferencia ya que las bacterias Gram positivas son más resistentes al calor^{2,30}.

Las bacterias que habitan en los manantiales termales son en su mayoría mesófilas, poseen temperaturas óptimas de crecimiento a 37°C, pero algunas se adaptan a condiciones de temperatura más elevada y pueden crecer a más de 45°C².

En ambientes acuáticos termales los principales microorganismos encontrados son especies del género *Pseudomonas*, como *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas stutzeri*, *Brevundimonas* spp, *Burkholderia cepacia*, *Ralstonia pickettii*, *Comamonas* spp, *Acinetobacter* spp y *Alcaligenes* spp¹. En estos habitats se encuentran con menor frecuencia bacterias Gram positivas, sin embargo se

pueden encontrar cocos Gram positivos y algunos patógenos oportunistas para el ser humano¹.

1.5.2. Género *Pseudomonas*.

Este género está constituido por bacilos Gram negativos aerobios que se mueven por medio de flagelos polares, sean únicos o en mechones³¹. Estos pueden ser rectos o ligeramente curvados, típicamente se disponen en pareja, aunque se describen como aerobios obligados, pueden crecer de forma anaerobia utilizando nitratos o arginina como aceptor alternativo para los electrones, algunas cepas aparecen mucoides por la abundancia de la cápsula de polisacárido, algunas de estas cepas producen pigmentos difundirles como *Pseudomonas aeruginosa*. Son ubicuos y se encuentran en el suelo, en compuestos orgánicos en descomposición, en la vegetación y en el agua, tienen requerimientos nutricionales mínimos y pueden tolerar un amplio espectro de temperaturas³².

1.5.2.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Es una bacteria Gram negativa aeróbica, patógeno oportunista de humanos y también en plantas. Esta presenta características tales como la producción de pigmentos difusibles, olor frutal y prueba positiva de la oxidasa, propiedades que permiten hacer una rápida identificación de la misma. Esta bacteria es la de mayor importancia clínica entre los bacilos Gram negativos no fermentadores³³. *Pseudomonas aeruginosa* se caracteriza por tener requerimientos nutricionales mínimos y por la habilidad de utilizar una amplia gama de compuestos orgánicos como fuente de energía, lo que le da una capacidad excepcional para colonizar nichos ecológicos donde los nutrientes son limitados³⁴. Se encuentra ampliamente distribuido en el suelo, agua, aguas termales, e incluso en soluciones desinfectantes de hospitales. Esta bacteria gracias a sus habilidades metabólicas contribuye con el mantenimiento del equilibrio biológico del ecosistema acuático donde se encuentre³⁵.

1.5.2.2. *Pseudomonas fluorescens*

Es una bacteria Gram negativa no fermentadora, ubicua se pueden encontrar en el agua, el suelo y pueden existir en fuentes acuosas de ambientes hospitalarios. Forman parte de la flora faríngea normal de los seres humanos. Se caracteriza por generar pigmentos fluorescentes, por producir sustancias con potencial antibiótico, biosurfactante^{33,36}, por degrada restos vegetales, animales y compuestos contaminantes como, tolueno, xileno, alcanfor otros en suelos y ambientes acuáticos³⁷.

1.5.2.3. *Pseudomonas stutzeri*

Es un miembro del género *Pseudomonas*, son microorganismos Gram negativos, catalasa y oxidasa negativos, que poseen flagelos polares, son usadas como agentes desnitrificantes y no producen pigmentos difusibles característicos que permite diferenciar esta especie de otras especies pertenecientes al género *Pseudomonas*¹. Cepas de este microorganismo son frecuentemente aisladas de fuentes de agua, superficies húmeda y manantiales mineromedicinales^{33,38}. Esta bacteria interviene en el ciclo del nitrógeno en los sistemas acuáticos, degradando los compuestos orgánicos nitrogenados, lo que contribuye con el mantenimiento del equilibrio biológico del ecosistema y a la autodepuración del agua de posibles contaminantes orgánicos³⁹.

1.5.3. Género *Ralstonia*

Ralstonia es un género de proteobacterias previamente incluido en el género *Pseudomonas*. Es el único miembro de la familia Ralstoniaceae compuestas por dos sublinajes. El primero *Ralstonia eutropha* que está formado por *Ralstonia basilensis*, *Ralstonia campiensis*, *Ralstonia eutropha*, *Ralstonia gilardii*, *Ralstonia metalidurans*, *Ralstonia oxalatica*, *Ralstonia paucula*, *Ralstonia repiraculi* y *Ralstonia taiwanensis*. Los miembros de este linaje tienen flagelos peritricos, no producen ácidos a partir de la glucosa y son sensibles a la colistina. El segundo *Ralstonia pickettii* formado por *Ralstonia insidiosa*, *Ralstonia mannitolytica*, *Ralstonia pickettii*, *Ralstonia solanacearum* y *Ralstonia syzygii*. Estas especies

tienen uno o más flagelos polares, producen ácido a partir de varios hidratos de carbono y son resistentes a la colistina³³.

Ralstonia pickettii, es otro bacilo Gram negativo, no fermentativo, patógeno oportunista de las salas de emergencia⁴⁰. Es de crecimiento lento, son ureasa positiva, algunas cepas pueden ser catalasa negativa y tienen motilidad débil por lo que es posible que no se detecte³³. Es un microorganismo ubicuo, puede encontrarse en diferentes partes del medio ambiente. Se han aislado cepas de esta bacteria en un gran número de fuentes de agua, incluyendo manantiales termales y en una amplia gama de entornos clínicos^{40,41}. *Ralstonia pickettii* tiene la capacidad de degradar compuestos orgánicos como benceno, nitrobenceno, tolueno, fenol entre otros, por lo que puede contribuir con la auto depuración de las aguas si son afectadas por factores de contaminación externos⁴².

1.5.4. Género *Burkholderia*

Género compuesto por siete especies que se clasificaban previamente como *Pseudomonas*, pero fueron reclasificadas como miembros del nuevo género *Burkholderia*³¹. La especie más representativa de este género es la *Burkholderia cepacia* que es un complejo de nueve especies genómicas que incluye *Burkholderia cepacia* (genoma variedad I), *Burkholderia multivorans* (genoma variedad II), *Burkholderia cenocepacia* (genoma variedad III), *Burkholderia stabilis* (genoma variedad IV), *Burkholderia vietnamiensis* (genoma variedad V), *Burkholderia dolosa* (genoma variedad VIII) y *Burkholderia pyrrocinia* (genoma variedad VIII)³³.

Burkholderia cepacia es una bacteria móvil, Gram negativa compleja, oxidada y catalasa positiva, es un organismo ubicuo y puede encontrarse en diferentes ambientes, tales como suelo, agua, plantas, fuentes animales y diferentes muestras clínicas³³. Tiene un metabolismo versátil por lo que puede crecer con requerimientos mínimos y sobrevivir en ambientes hostiles por largos períodos de tiempo en agua destilada, desinfectantes, equipos hospitalarios y manantiales termales^{41,43,44}. Estos microorganismos desempeñan un papel fundamental en los

ciclos biogeoquímicos del carbono, son capaces de transformar compuestos orgánicos para utilizarlo como fuente de energía y de esta forma ayudar con el equilibrio de los ecosistemas acuáticos ⁴⁵.

1.5.5. Género *Comamonas*

Es un género de proteobacteria. Constituido por las especies *Comamonas terrigena*, *Comamonas aquatica* y *Comamonas testosteroni*. Son bacterias Gram negativas, son aeróbios, móviles a través de varios flagelos polares, se encuentran ampliamente distribuidos en el medio ambiente y son saprofitos frecuentemente del suelo y el agua³³.

Comamonas testosteroni fue reclasificada dentro de un nuevo género como *Comamonas testosteroni* en 1987 gracias a estudios genéticos. *Comamonas testosteroni* es un bacilo Gram negativo, no fermentativo de glucosa, móvil y no esporulado⁴⁶. Este microorganismo es ubicuo, en el medio ambiente puede encontrarse en el suelo, lodo, agua, manantiales termales y ambientes hospitalarios^{46,47,48,49}. Posee gran adaptabilidad metabólica lo que le permite reproducirse y colonizar estos ambientes. Gracias a su versatilidad metabólica es un microorganismo de importancia ecológica, ya que es capaz de mineralizar complejos compuestos aromáticos xenobióticos, tal como el 4-cloronitrobenceno ampliamente usado como pesticida en actividades agrícolas, para utilizarlos como fuentes de carbono y nitrógeno para obtener energía, y de esta manera contribuir con la degradación de contaminantes en los diferentes nichos ecológicos en los que puede habitar^{50,51,52}.

1.5.6. Género *Shewanella*

Las bacterias del género *Shewanella* son bacilos Gram negativos, se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza principalmente en ambientes marinos, pertenecen a la familia Vibrionaceae e incluye las especies *Shewanella putrefaciens*, *Shewanella hanedai*, *Shewanella benthica* y *Shewanella algae*⁵³.

Shewanella putrefaciens es un bacilo Gram negativo que tiene la capacidad de producir H₂S en los medios de selección bioquímica³³. Primero clasificada como

Achromobacter putrefaciens, la bacteria perteneció a los géneros *Pseudomonas* y *Alteromonas*. En 1985, fue clasificada en el género *Shewanella*, en el que ya son reconocidas 40 especies con base en la caracterización molecular. La participación de esta bacteria en procesos patológicos humanos es considerada poco común. Sin embargo, el espectro clínico atribuido a la infección por este agente es muy variado⁵⁴.

Shewanella putrefaciens se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, su hábitat natural incluye el agua y el suelo. Se ha encontrado en todas las formas de agua dulce, mar, río, manantiales termales y aguas residuales^{55,56,57,58}. Así como en los animales que habitan en estos ambientes ostras, las ranas, peces, se también se han aislado cepas de este microorganismo en alimentos como leche, mantequilla, huevos, la carne y en compuestos orgánicos gas natural, y petróleo. Además es uno de los principales organismos que producen la descomposición de alimentos refrigerados ricos en proteínas⁵⁹. Es un microorganismo importante desde el punto de vista ecológico, debido a que participa en los procesos naturales de bioremediación ambiental por su capacidad de degradar varios contaminantes orgánicos⁶⁰.

1.5.7. Género *Staphylococcus*

Los estafilococos conforman un importante grupo de patógenos para el ser humano y originan un amplio espectro de enfermedades sistémicas que pueden poner en peligro la vida. La mayor parte de estos microorganismos tienen un diámetro entre 0,5 μm y 1 μm , se desarrollan en un patrón similar al de un racimo de uvas, son anaerobios facultativos, inmóviles. Son capaces de crecer en medios con elevadas concentraciones de sal y elevadas temperaturas por lo que pueden ser encontrados frecuentemente en fuentes de aguas termales³².

El hábitat natural de *Staphylococcus* es la piel de los mamíferos, sin embargo se pueden encontrar en otras partes del cuerpo como la garganta, la boca, las glándulas mamarias y el tracto intestinal. Estas especies están diseminadas en la naturaleza y pueden hallarse en diversos ambientes, tales como suelo, arena d e

playa y en aguas, así como en alimentos y productos animales como lo son leche, huevos, queso y carne^{33,61}.

1.6. Microorganismos que viven a elevada temperatura

Según la temperatura óptima de crecimiento de los organismos es posible distinguir cuatro grupos:

1. Los microorganismos cuya temperatura óptima de crecimiento está alrededor de los 30°C a 37°C, se les denominan mesófilos y se encuentran en animales de sangre caliente y en ambientes de latitudes templadas y tropicales²⁹.
2. Aquellos microorganismos con temperaturas de crecimiento por encima de los 45°C se les consideran termófilos, muchos se hallan presentes en aguas y otros ambientes termales, tales como sedimentos, lodos, rocas y en asociación con otros microorganismos algas, plantas y animales²⁹.
3. Los microorganismos que presentan temperaturas de crecimiento superior a los 80°C se les conocen como hiptermófilos, se pueden encontrar en hábitats muy concretos como géiser y fuentes hidrotermales^{29,62}.

En aguas termales se encuentran muchos microorganismos que se desarrollan en diferentes temperaturas, debido a que el agua hirviendo que fluye gradualmente se enfría y forma lo que se conoce como gradiente térmico, que favorece el crecimiento de una gran diversidad de microorganismos²⁹.

El límite de temperaturas a la que se puede encontrar organismos no se conoce aún, se cree que sobre los 150°C ninguna forma de vida podría evitar la ruptura de los enlaces químicos que forman el ADN y otras moléculas esenciales. En función de la temperatura de crecimiento, los organismos se clasifican de la siguiente manera^{62,63}.

Tabla 1. Clasificación de los microorganismos que viven a elevadas temperaturas.

Temperatura	Descripción
Hipertermófilos	Su temperatura óptima de crecimiento está por encima de los 80°C y el máximo crecimiento de cultivos puros se ha llegado a dar entre 110°C y 113°C.
Termófilos	Crece por encima de los 45°C.
Mesófilos	Temperatura óptima alrededor de 37°C. Frecuentemente son capaces de crecer en rangos alrededor de 25 a 45°C.

Fuentes: Ortiz, E. (2002)

Ramirez, N. (2006)

Nniehaus, F. (1999).

1.7. Adaptaciones de los microorganismos que viven a elevadas temperaturas.

Los microorganismos que son capaces de crecer a temperaturas entre 45°C-110°C pertenecen a los dominios Bacteria y Archaea dos grupos en el que se clasifican actualmente los organismos procariotas²⁹.

La estabilidad a elevadas temperatura de las proteínas de los termófilos e hipertermófilos se atribuye en parte a las interacciones electrostáticas, un incremento en la formación de puentes salinos (enlaces iónicos entre cargas positivas y negativas de los aminoácidos) presentes en la región interna de las proteínas las hace naturalmente resistentes al desdoblamiento⁶⁴.

La membrana citoplasmática de las bacterias termófilas es rica en ácidos grasos saturados (C₁₈-C₂₄), que forman entre sí enlaces hidrófobos muy estables al calor, en el caso de las Archaea, la membrana no contiene ácidos grasos. En su lugar posee hidrocarburos de cadena larga muy especiales formados de éteres de hidrocarburo unidos al glicol (el enlace éter es más resistente). Algunos presentan una monocapa de C₄₀- bifitanil – tetraéteres, (como resultado de la unión cola con cola de 2 moléculas de C₂₀- fitanil- diéteres) que condiciona una extrema resistencia a agentes ambientales⁶².

Otro factor que interviene en la termo estabilidad de algunos microorganismos es la presencia de proteínas especiales denominadas chaperoninas, que tienen dos actividades enzimáticas diferentes la apertura y cierre de la hélice de ADN impidiendo su desnaturalización⁶⁵.

Estudios realizados en la secuencia de aminoácidos de las proteínas en microorganismos mesófilos y termófilos indican que pequeños cambios en el contenido de aminoácidos, en puntos claves permiten aumentar la estabilidad de las proteínas termófilas, además que mejora las interacciones electrostáticas^{64,66}.

1.8. Actividad biológica y enzimática de los microorganismos que viven a elevadas temperaturas.

La mayoría de los microorganismos que viven en ambientes termales tiene la capacidad de producir varias sustancias de interés biológico⁶⁴, de las que se pueden obtener compuestos farmacéuticos y de interés biotecnológico (antibióticos, hormonas, esteroides transformados), disolventes, ácidos orgánicos, materias prima químicas, biopolímeros, biosurfactantes, aminoácidos y enzimas. Los microorganismos también pueden utilizarse para producir combustibles y productos relacionados con la energía^{67,68}.

1.8.1. Antibióticos

Son sustancias químicas producidas por algunos microorganismos vivos que muestra actividad inhibitoria germicida frente a otros microorganismos *in vivo* o *in vitro*. Los antibióticos son productos del metabolismo secundario de hongos, bacterias, algas y líquenes⁶⁹, los principales en usos clínicos son β -lactámicos, penicilina, cefalosporina, aminoglicósidos y tetraciclinas. Los antibióticos a nivel industrial son obtenidos por fermentación microbiana. Este método de producción tiene rendimientos relativamente bajos, sin embargo debido a la elevada actividad terapéutica de los compuestos antimicrobianos obtenidos y en consecuencia a su alto valor económico, se pueden producir comercialmente empleando esta metodología²⁹.

1.8.2. Bioconversión microbiana

El uso de los microorganismos para este fin se denomina bioconversión o biotransformación e implica el crecimiento de los microorganismos en grandes fermentadores, seguido de la adición en el momento oportuno del producto químico que se va a convertir. Después de un tiempo de incubación, donde el

microorganismo actúa sobre el producto químico, se extrae el caldo fermentado y se purifica el producto deseado. Aunque el principio de bioconversión se utiliza para gran variedad de procesos, su principal uso práctico es la producción de hormonas esteroideas²⁹.

1.8.3. Ácidos orgánicos

Un gran número de compuestos orgánicos se producen comercialmente mediante la utilización de microorganismos²⁹. Estos tienen gran importancia a nivel industrial y los principales productos son el ácido cítrico, láctico, acético, fumárico y glucónico. Los ácidos orgánicos son obtenidos por procesos de fermentación, algunos de los microorganismos usados en la obtención de ácidos orgánicos son *Aspergillus niger*, para la producción de ácido cítrico y ácido glucónico, *Rhizopus nigricans* para la obtención de ácido fumárico y *Lactobacillus delbrueckii* para generar ácido láctico⁶⁸.

1.8.4. Bioinsecticidas

Son productos de origen natural o incluso organismos vivos que sirven también para el control de insectos. Existen muchas alternativas para el uso de bacterias, virus y hongos como bioinsecticidas. Entre los agentes bacterianos se encuentran diversas especies de *Bacillus* especialmente *Bacillus thuringiensis*⁶⁸.

1.8.5. Biopolímeros

Son polímeros producidos por microorganismos, utilizados para modificar las características de flujo de los líquidos y para actuar como agentes gelificantes, estos son empleados en muchas áreas de la industria farmacéutica y alimentaria. Algunos de los biopolímeros conocidos son microfibrillas de celulosa producida por una cepa especial *Acetobacter*, dextrano generado por los principales géneros *Klebsiella*, *Acetobacter* y *Leuconostoc*, xantato es obtenido de especie *Xanthomonas campestris* y ciclodextrina producida por *Thermoanaerobacter*⁶⁸.

1.8.6. Biosurfactantes

Son compuestos utilizados en la emulsificación, para la humectación y dispersión de fase. Actualmente se ha despertado un creciente interés por la utilización de biosurfactantes, debido a sus aplicaciones medio ambientales, entre ellas la capacidad de biodegradarse; que es uno de los principales requisitos para el uso de un surfactante. Los surfactantes de origen microbiano de más amplio espectro son los glucolípidos que contienen regiones hidrófilas e hidrófobas específicas. La estructura del compuesto y características finales dependen de las condiciones de crecimiento, así como de la fuente de carbono utilizada⁶⁸.

1.8.7. Aminoácidos y vitaminas

Las vitaminas y los aminoácidos son factores de crecimiento que con frecuencia tienen usos farmacéuticos o son añadidos a los alimentos. Varias vitaminas y aminoácidos se producen comercialmente a través de procesos microbianos²⁹.

La mayor parte de las vitaminas se fabrican comercialmente por síntesis química. Sin embargo hay algunas muy complicadas para ser sintetizadas por esta ruta, por lo que se fabrican por fermentación microbiana. Ejemplos importantes de esto son la vitamina B₁₂ y la riboflavina. Para la producción industrial de vitamina B₁₂, se emplean cepas microbianas del género *Propionibacterium* y otra bacteria utilizada es *Pseudomonas denitrificans*. Por su lado la riboflavina es sintetizada por varios microorganismos que incluyen hongos, bacterias y levaduras. Uno de los más usados, por sus excelentes porcentajes de producción es el hongo *Ashbya gossypii*²⁹.

1.8.8. Enzimas

Las enzimas son proteínas que tienen la capacidad de facilitar y acelerar las reacciones químicas que tienen lugar en los tejidos vivos. Cada organismo produce una gran variedad de enzimas, la mayoría solo se produce en pequeñas cantidades y están implicadas en procesos celulares. Sin embargo algunos microorganismos producen ciertas enzimas en cantidades mucho más grandes y

en lugar de mantenerlas dentro de la célula, las excretan al medio. Habitualmente las enzimas extracelulares son capaces de digerir materiales nutrientes insolubles como la celulosa, proteínas y almidón, siendo transportados al interior de la célula los productos de digestión. Algunas de las enzimas extracelulares son utilizadas en la industria alimentaria, farmacéutica, textil y se producen en gran cantidad por síntesis microbianas²⁹.

Algunas enzimas producidas por microorganismos que viven a elevadas temperaturas.

Proteasas

Son las enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlace peptídicos en los polipéptidos y proteínas⁷⁰. Las enzimas microbianas que se producen en mayor cantidad industrialmente son las proteasas bacterianas, estas enzimas se aíslan de bacterias alcalófilas principalmente de especies de *Bacillus* como *Bacillus licheniformis*²⁹.

Lipasas

Son las enzimas que catalizan la hidrólisis de cadenas largas de triglicéridos. Actualmente se despertó gran interés en las lipasas microbianas, debido al rápido desarrollo de la tecnología enzimática. Las lipasas constituyen el grupo de biocatalizadores con mayor potencial en las aplicaciones biotecnológicas⁷¹.

Celulasas

Son enzimas que hidrolizan la celulosa y son producidas por un gran variedad de de bacterias y hongos aeróbios o anaeróbios, mesófilos o termófilos⁷². Las bacterias celulolíticas incluyen especies de *Cellulomonas*, *Clostridium thermocellum*, algunas especies de *Pseudomonas* y *Ruminococcus*⁷³.

Amilasas

Las amilasas son enzimas las cuales hidrolizan moléculas de almidón, dando como productos dextrinas y polímeros compuestos progresivamente por unidades de glucosa⁷⁴. Esta familia de enzimas hidrolíticas está compuesta por las proteínas

catalíticas: alfa-amilasa, beta-amilasa; glucoamilasa; isoamilasa, que juegan un rol muy importante en la degradación del almidón²⁹. Las enzimas bacterianas, en especial las amilasas son obtenidas de *Bacillus subtilis* y sus congéneres, son de fácil producción y son ampliamente utilizadas en la industria⁶⁹.

Todos estos compuestos bioactivos son el resultado de la actividad metabólica de los microorganismos⁷⁵, que a menudo se clasifican como metabolitos primarios y secundarios⁶⁸.

1.9. Aplicaciones farmacéuticas y biotecnológicas de microorganismos que viven a elevadas temperaturas

Los microorganismos han sido utilizados por el hombre para obtener diversos productos desde la antigüedad, aun sin conocer el fundamento científico en el que se basan⁶⁹.

La industria química y farmacéutica utiliza los microorganismos como herramienta para la producción de compuestos de interés de diferente naturaleza. La aplicación más extendida en este ámbito es la producción de antibióticos. Además tienen importancia considerable en la producción de vitaminas, aminoácido, en la producción de vacunas y en la obtención de ciertos compuestos orgánicos como el etanol, la acetona y el vinagre^{70,75}.

Las enzimas o microorganismos son empleados como biocatalizadores en procesos industriales que requieren de condiciones fuertes. Estos biocatalizadores, llamado también extremoenzimas producida por microorganismos, son proteínas que funcionan en condiciones extremas. Debido a su extrema estabilidad, las extremoenzimas ofrecen nuevas oportunidades de biocatálisis y biotransformación. Ejemplos de extremoenzimas son: celulasas, amilasas, proteasas, las pectinasas, keratinases, lipasas, las esterasas, catalasa, peroxidasa y las fitasas^{65,76}.

Los tipos de extremoenzimas son requeridas también en la industria de detergentes, alimentos, almidón, textiles, cueros y papel^{11,77}.

Una aplicación biotecnológica de bacterias incluye también la construcción genética de súper cepas de microorganismos que realicen tareas particulares en el medio ambiente. Por ejemplo: las bacterias que son genéticamente diseñadas para degradar productos petrolíferos se utilizan en actividades de limpieza en derrames de petróleo⁷⁸

1.10. Antecedentes de investigaciones en manantiales de aguas termales en Venezuela y el estado Mérida.

Las fuentes hidrotermales en nuestro país han sido objeto de numerosos estudios geológicos y fisicoquímicos, los cuales se iniciaron desde 1800 con los viajes de Humboldt a Venezuela^{19,79}

En la época de los 80 surgió mucha de información sobre estudios en aguas termales impulsados durante el Inventario Geotérmico Nacional, en las regiones del centro, sur y oriente del país. El propósito de estas investigaciones estuvo orientado a determinar el origen de las aguas termales, geoquímica, geotermometría y los patrones de mezclas⁷⁹.

Uno de los primeros trabajos en el estudio de aguas termales fue reportado por Shubert en 1980, en este se hace una breve descripción de la localización de la fuente La Mitisús en el estado Mérida⁸⁰.

Para el año 1981 Burguera y col. realizaron trabajos donde describen que el estado Mérida cuenta con 18 manantiales de aguas termales conocidas, exponiendo para cada una de ellas las formaciones geológicas de las zonas en las que emergen; entre las que se encuentran: Aguas Calientes, Chiguará, Tabay, Piñango, Santa Apolonia, Bocadillos, Los Giros, Zea, Jají, Santa María de Caparo, Carbonera, Bailadores, Caño Zancudo, Quebrada Sucia, Chama, Mucuchíes, La Culata y Canaguá⁸¹. Otros estudios realizados por Doudelet en el mismo año, describen 15 fuentes termales presentes en el estado Mérida, clasificadas por su

origen y composición mineral⁸². Finalmente trabajos realizados por Burguera y col. en 1982, clasifican las aguas termales del estado de acuerdo a los minerales disueltos, en fuentes termo-sulfuradas, fuentes termo-sulfatadas, fuentes termo alcalinas, termo-litínicas, además de reportar la descripción ecológica de las regiones donde se ubican cada una de dichas fuentes⁸³.

Estudios enfocados al ámbito físico, químico y sanitario de las fuentes hidrotermales, se han llevado a cabo a lo largo de los años. Burguera y col. en 1981 reportan la localización de 16 fuentes termales para el estado Mérida, a las cuales se les realizaron estudios físico-químicos, para determinar la cantidad de minerales, expresados en cationes y aniones, como también temperatura, aspecto, olor/ sabor, pH, densidad y conductividad específica⁸⁴. Así mismo en otro trabajo ejecutado por Burguera y col. en el año 1982, se describe la localización, acceso, características físicas del área, análisis físicos-químicos, bacteriológicos y usos farmacológicos para 15 fuentes: Aguas Calientes, Chiguará, Tabay, Piñango, Santa Apolonia, Bocadillos, Los Giros, Zea, Jají, Bailadores, Caño Zancudo, Quebrada Sucia, Chama, Mucuchíes y Santa María de Caparo²¹.

Estudios en el ámbito hidroquímico realizados por Barrientos y col. en el año 2000 han permitido caracterizar el agua de los manantiales Cumbotico y Cumbote, Colonia Tovar, en función del ión dominante, determinando así su grado de mineralización y niveles de contaminación microbiana⁸⁵.

Adicionalmente investigaciones desarrolladas por Avila y col. en el año 2006, con la finalidad de caracterizar la calidad microbiológica de las aguas termales del parque las Cocuizas en Maracay, reportan haber encontrado Amibas de vida libre potencialmente patógenas⁸⁶.

Posteriormente en el año 2007 Moreno y col. estudiaron en las fuentes hidrotermales del estado Trujillo, donde evaluaron parámetros físicos y químicos, tales como la temperatura de emergencia de la fuente, aspecto, olor, sabor, caudal, mineralización, dureza, concentraciones iónicas de metales y aniones más importantes en la caracterización de aguas subterráneas; para clasificarlas en

cuanto a su composición química y termalismo. Además se realizaron análisis bacteriológicos, donde se determinó la presencia de coliformes fecales y totales⁸⁷.

En la actualidad los estudios de aguas termales en diferentes partes del mundo, se han inclinado al aislamiento de microorganismos con actividad biológica de importancia farmacéutica y biotecnológica^{4,6,7,8,62,88,89,90,91}, sin embargo en Venezuela son pocos los estudios realizados en este campo^{11,92,93}.

Es evidente que el estudio en aguas termales ha evolucionado a través del tiempo. Desde trabajos donde solo se discutía el origen, localización, ambiente y la determinación de algunos parámetros físico-químicos de los manantiales termales, hasta estudios mucho más elaborados para el aislamiento, identificación y detección de microorganismos con diversas propiedades y actividades biológicas, lo cual es de gran importancia en la actualidad, debido a que representan una fuente de productos naturales de interés biotecnológico y farmacéutico.

www.bdigital.ula.ve

Capítulo 2. Antecedentes de la Hipótesis, Hipótesis y Objetivos

www.bdigital.ula.ve

2. Antecedentes de la hipótesis

Pakpitcharo y col. en el año 2008, estudiaron diferentes *Bacillus* termotolerantes aislado de aguas termales y muestras solidas provenientes de 76 manantiales termales en Tailandia, evaluando el potencial de los microorganismos para producir agentes biosulfactantes, biocatalizadores y las propiedades antimicrobianas⁵.

Así mismo Schell y col. entre los años 2008-2010, evaluaron las propiedades antimicrobianas de la fase líquida (FL) del fango de Copahue de las aguas termales en Neuquén Argentina, mediante ensayos *in vitro* sobre cepas de *S. aureus* colonizantes de piel y mucosas, aisladas de pacientes provenientes de la comunidad y hospitales⁶.

Posteriormente en el año 2011 Saikia y col. en la India aislaron la cepa bacteriana denominada BPM3 del lodo de las aguas termales de Assam, la cual resultó ser un potente inhibidor del crecimiento de hongos fitopatológicos como (*Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*, *Fusarium semitectum*, *Magnaporthe grisea* y *Rhizoctonia oryzae*) y de bacterias Gram positivas como (*Staphylococcus aureus*)⁷.

Simultáneamente Pallavi y col. en el 2011, en la India, analizaron los microorganismos aislados de muestras tomadas en las aguas termales en Maharashtra. Se evaluó la actividad biológica de las cepas encontradas (actinomicetos y eubacteria) y encontraron que seis de las cepas aisladas tenían potencial antimicrobiano⁸.

Del mismo modo Mukherjee y col. en el año 2012, identificaron y caracterizaron la secreción verde (metabolito secundario) producida por *Pseudomona aeruginosa* cepa GIM 32, aislada de las aguas termales de Bakreshwar en la india, ellos observaron que la secreción analizada inhibía el crecimiento de bacterias Gram negativas como *Escherichia coli*⁹.

Adicional al gran potencial que tienen los microorganismos que viven en los manantiales termales, como fuente de productos biológicamente activos de interés farmacéutico, estos también representan un importante recurso generador de compuestos con aplicaciones biotecnológicas tal como se muestra a continuación.

Posada y col. en 2004, realizaron estudios sobre la microbiota en el manantial termomineral de la región andina de Paipa, Boyacá Colombia, donde lograron aislar ocho cepas bacterianas a través del método del número más probable (NMP), denominadas P4-6, P4-7, P4-8, P4-9, P4-10, P4-11, P4-12 y P4-13. Estas cepas crecieron a temperaturas óptimas entre 60 - 65 °C y exhibieron un metabolismo fermentativo, siendo el principal producto de fermentación etanol, seguido de acetato, CO₂ e hidrógeno¹².

Posteriormente en el año 2007, Cuellar y col. aislaron y caracterizaron microorganismos capaces de crecer a temperaturas superiores a 40°C en las aguas termales del Municipio Ayacucho, en el estado Táchira, Venezuela. Ellos reportan haber aislado 27 microorganismos, constituidos por 18 bacterias, dos hongos y cinco estructuras semejantes a actinomycetos¹³.

Paralelamente, Sheble y col. en el año 2007, identificaron microorganismos de fuentes termales en Egipto, de las cuales consiguieron aislar tres bacterias termófilas con la capacidad de crecer a temperaturas de 75°C, designadas como EHP1, EHP2 y EHP3, entre las cuales la cepa EHP2 presentó capacidad enzimática para degradar celulosa¹⁴.

Alarcón y col. en el año 2009, analizaron la microbiota de los manantiales termales ubicados en el estado Táchira, Venezuela. Estos investigadores señalan haber encontrado la presencia de bacilos Gram negativos y de tres bacterias termófilas denominadas C30- C35-C36 en dicha fuente, estos últimos con posible capacidad de degradar azufre¹⁵.

De igual forma en el 2009 Fooladi y col. aislaron e identificaron *Bacillus* spp. cepa termófila productora de α – amilasa en tres fuentes de aguas termales en Irán¹⁶.

Nava y col. en el año 2010, aislaron dos bacterias termófilas de los géneros *Thermus* y *Geobacillus* provenientes de las aguas termales de la provincia de Salta, Argentina. Ellos realizaron el análisis preliminar de las secuencias obtenidas para la bacteria del género *Thermus*, utilizando un equipo de secuenciación masiva de ADN. Identificaron y caracterizaron genes que codifican enzimas utilizadas en procesos de transformación de alimentos y relacionadas con la degradación de polímeros, tales como xilanasas, proteasas, esterases, lipasas, catalasas y galactosidasas¹⁷.

Finalmente en 2012 Obeidat y col. realizaron estudios para aislar, caracterizar e identificar las especies termófilas en cinco manantiales de aguas termales en Jordania. Los autores aislaron e identificaron ocho bacterias termófilas pertenecientes al género *Geobacillus*, todas con potencial actividad enzimática, capaces de producir amilasa, caseinasas, fosfatasas ácidas y alcalinas, esterasa, α -galactosidasa, β -glucosidasa entre otras enzimas de interés biotecnológico⁹⁴.

Un gran número de países se encuentra dedicado al estudio de la diversidad microbiana que habita las fuentes de aguas termales, debido al potencial uso farmacéutico y biotecnológico que tienen los microorganismos aislados de estos ambientes acuáticos. Acorde con lo anteriormente expuesto se plantea lo siguiente:

2.1. Hipótesis

El agua de los manantiales termales ubicados en los sectores La Mitisus y Santa Apolonia del estado Mérida contienen una población microbiana abundante y biodiversa, característica de cada manantial, con especies microbianas que pueden poseer actividades biológicas diversas de interés farmacéutico y biotecnológico.

2.2. Objetivo general

- Aislar, identificar y detectar microorganismos con actividades biológicas de interés farmacéutico y biotecnológico, presentes en las aguas de los manantiales termales ubicados en los sectores La Mitisús y Santa Apolonia del estado Mérida.

2.3. Objetivos específicos

- Empleando el método de filtración de membrana aislar bacterias heterótrofas aerobias viables mesófilas presentes en las aguas de los manantiales termales ubicados en los sectores La Mitisús y Santa Apolonia del estado Mérida.
- Utilizando las pruebas de identificación comercial API© y pruebas bioquímicas identificar taxonómicamente las colonias microbianas aisladas.
- Usando el método de difusión en agar detectar actividades biológicas antibacteriana y antifúngica en los microorganismos aislados e identificados en las aguas de los manantiales termales ubicados en los sectores La Mitisús y Santa Apolonia del estado Mérida.
- Determinar actividades enzimáticas: amilolítica, amonificante, celulolítica, lipolítica y proteolítica, en los microorganismos aislados e identificados en las aguas de los manantiales termales ubicados en los sectores La Mitisús y Santa Apolonia del estado Mérida.
- Haciendo uso del método de Kirby Bauer realizar pruebas de susceptibilidad a antibióticos de las bacterias heterótrofas aerobias viables mesófilas presentes en las aguas de los manantiales termales ubicados en los sectores La Mitisús y Santa Apolonia del estado Mérida.

Capítulo 3. Metodología

www.bdigital.ula.ve

3. Población de estudio y locación de muestreo.

La población de estudio son los microorganismos heterótrofos, mesófilos, aerobios viables, con actividades biológicas y enzimáticas de interés farmacéutico, presentes en las aguas de los manantiales termales La Mitisús y Santa Apolonia del estado Mérida.

3.1. Ubicación de la fuente termal La Mitisús.

Está ubicada en el Municipio Cardenal Quintero, Parroquia Las Piedras, estado Mérida en la carretera Barinas – Santo Domingo a 50 m de la represa José Antonio Páez, en dirección a La Mitisús. El manantial se encuentra aproximadamente a 3 m sobre la carretera en el talud sur. Es de caudal pequeño y no emite olores⁸⁰.

3.2. Ubicación de la fuente termal Santa Apolonia.

Este se encuentran al norte de la población de Santa Apolonia Municipio Tulio Febres Cordero (cerca de Caja Seca) allí se encuentran varios brotes; uno sobre el río Oso y tres cerca del río San Pedro. Los manantiales son de fácil acceso y los diferentes brotes de las fuentes ubicados antes de la población de Santa Apolonia, cuenta con vía pavimentada⁸².

3.3. Metodología

3.3.1. Toma de muestras

Se tomaron muestras de agua de los manantiales ubicados en los sectores La Mitisús y Santa Apolonia del estado Mérida (Figura 2).

Se realizaron dos muestreos en cada uno de los sitios anteriormente señalados entre los meses de Junio - Julio del 2013. El intervalo de tiempo entre cada muestreo no sobrepasó el plazo de dos semanas, siendo las fechas correspondientes a cada muestreo las siguientes:

Muestreo 1 Santa Apolonia: 29/6/13.

Muestreo 1 La Mitisús: 6/7/13.

Muestreo 2 Santa Apolonia: 13/7/13.

Muestreo 2 La Mitisús: 20/7/13.

En cada uno de los muestreos se tomaron dos muestras:

Manantial de Santa Apolonia

Las muestras fueron tomadas una en la naciente del afluente termal y otra en el centro de la piscina del balneario llamado el Rón.

Manantial La Mitisús

Las muestras fueron tomadas una en la naciente del afluente termal y otra en la manguera que drenaje del cauce del manantial ubicado en el sector al Mitisús.

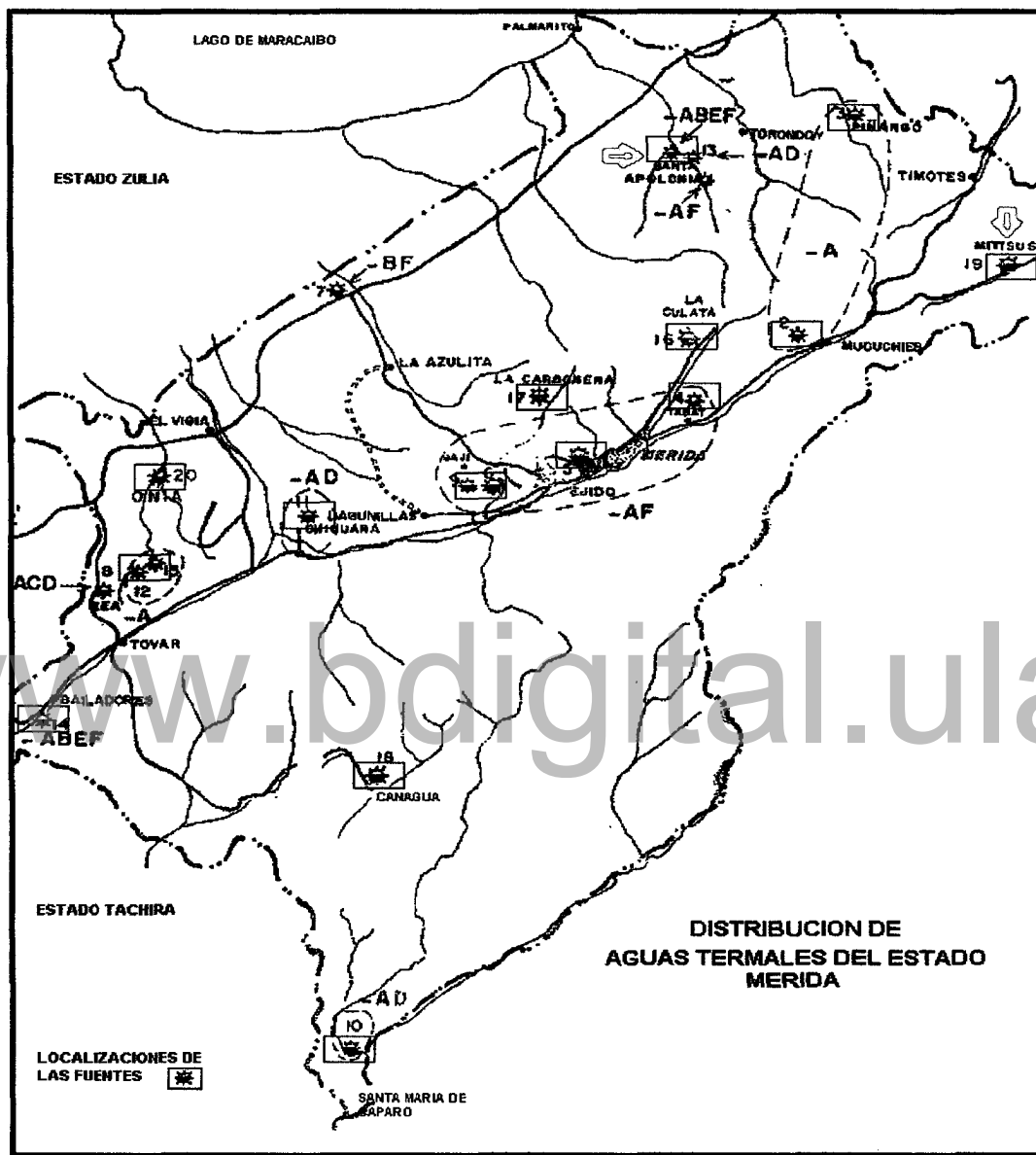
Las muestras fueron tomadas en las primeras horas de la tarde, se captaron en frascos de vidrio estériles que se mantuvieron cerrados, hasta el momento de tomar las muestras. Una vez destapado el frasco se llenó con agua del manantial termal, y se tapó inmediatamente.

Al hacer la toma de la muestra se dejó un espacio aéreo en el frasco, de aproximadamente 2,5 cm, para facilitar la mezcla por agitación antes de proceder al estudio. El procedimiento se realizó manualmente, sosteniendo el frasco con una mano.

El volumen de cada muestra fue de 500 mL, siendo suficiente para realizar todos los análisis microbiológicos previstos. Cada frasco fue rotulado, identificando la fecha y el lugar de procedencia de la muestra, acompañado con una descripción, en un registro separado, de la hora en que se tomó la muestra y temperatura del agua.

Luego de ser tomadas las muestras, las mismas fueron colocadas en una cava a temperatura ambiente, para su traslado al Laboratorio de Microbiología del Agua,

Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, en la ciudad de Mérida, donde se realizaron los análisis microbiológicos.



Fuente: www.pdv.com/lexico/menes/aguter.htm

Figura 2. Mapa de las aguas termales del estado Mérida.

3.3.2. Determinación de temperatura y pH

En cada uno de los sitios de muestreo se midió la temperatura del agua y la del ambiente utilizando un termómetro con una sensibilidad de una décima de grado. Una vez en el laboratorio se determinó el pH de las muestras recolectadas mediante un pH Metro electrónico.

3.3.3. Métodos para el análisis microbiológico de las aguas termales La Mitisús y Santa Apolonia.

3.3.3.1. Aislamiento de bacterias heterótrofas viables aerobias mesófilas.

El aislamiento de las bacterias heterótrofas viables mesófilas se realizó, por la técnica de filtración por membrana⁹⁵.

El procedimiento consistió en hacer pasar a través de un filtro de membrana aplicando vacío, un volumen de 100 mL de muestra de agua termal. Una vez filtrado el volumen necesario de agua con ayuda de una pinza de punta roma se retiró el filtro de membrana y se colocó en la caja de Petri con Agar Plate Count (PC). Las placas se incubaron a 37°C por 24 a 96 horas. Transcurrido el periodo de incubación, se observaron las placas.

Para obtener colonias aisladas se procedió según lo establecido por American Public Health Association APHA (1992), la cual recomienda para el análisis de agua realizado por el método de filtración de membrana, si se tiene un crecimiento confluyente de microorganismos sobre la superficie del filtro, se deben tomar porciones de la población bacteriana, resembrarlas en placas de medios apropiados y obtener colonias aisladas por agotamiento.

Se tomaron porciones de la población bacteriana principalmente en sitios donde se observó coloración, centro y bordes del filtro. Estos se sembraron en placas con Agar Brain Heart infusión (BHI) y se incubaron a 37°C por 24 a 96 horas. Las colonias más representativas y morfológicamente diferentes se repicaron en diferentes agares: Plate Count (PC), McConkey (MK), eosina azul de metileno

(EAM), Bair Parker (BP), sangre (Sg), R₂A, Manitol salado (Ms), cetrimida (C) y se incubaron a 37°C por 24 a 96 horas. Este procedimiento se repitió hasta lograr obtener cultivos axénicos.

Las cepas aisladas, se sembraron en tubos de ensayo con Agar nutritivo y se guardaron en la nevera para su posterior identificación.

3.3.3.2. Identificación de bacterias heterótrofas viables aerobias mesófilas.

A cada cepa aislada, se les realizaron pruebas bioquímicas según los esquemas de identificación de MacFaddin (2003)⁹⁶, complementadas con las pruebas recomendadas por Barrow y Feltham (1993)⁹⁷ y las galerías API® (Biomerux), para identificar género y especie de las cepas.

Las pruebas bioquímicas empleadas para la identificación de las cepas aisladas fueron las siguientes:

Tinción de Gram: Debe su nombre al Bacteriólogo Danés Christian Gram que la desarrolló en 1844. Es una tinción diferencial, clasificando a las bacterias en Gram positivas y Gram negativas, de acuerdo a las propiedades de su pared celular⁹⁷.

Técnica: Masa bacteriana de los aislados obtenidos fue fijada mediante calor en un portaobjetos, posteriormente se les aplicó colorante Violeta cristal y se lavaron con agua. Seguidamente se les adicionó solución de Lugol y se lavaron con agua. Finalmente se decoloraron con una mezcla alcohol-cetona, se lavaron nuevamente con agua y se les aplicó colorante Safranina. Luego las placas se dejaron secar y fueron observadas al microscopio para determinar la morfología de los microorganismos^{96,97}.

Prueba oxidasa: Esta prueba se basa en la detección de la enzima citocromo oxidasa, la cual transfiere electrones al oxígeno, aceptor final en la cadena transportadora de electrones de ciertos microorganismos. El dihidrocloruro de tetrametil-p-fenilendiamina al 1% p/v es el colorante utilizado en esta prueba y actúa como sustituto del oxígeno. En presencia de citocromo oxidasa y oxígeno

atmosférico, el reactivo es oxidado a azul de indofenol compuesto de color púrpura lo cual indica que la reacción es positiva⁹⁸.

Técnica: Sobre un portaobjetos se colocó un trozo de papel filtro, se añadió 2 gotas de la solución dihidrocloruro de tetrametil-p-fenilendiamina al 1% p/v y con ayuda de un palillo de madera se depositó masa bacteriana de bacilos Gram negativos sobre el reactivo⁹⁶.

Prueba de Hugh y Leifson oxidación fermentación (O/F): Esta prueba se realiza para la determinación del metabolismo oxidativo o fermentativo de los carbohidratos⁹⁷. Los microorganismos oxidativos sólo producen ácidos que cambian el color del medio de verde a amarillo en el tubo abierto expuesto al oxígeno atmosférico; los microorganismos fermentadores producen ácidos en los dos tubos cambiando el color del medio de verde a amarillo en ambos tubos³³. Esta prueba ayuda a la identificación de las bacterias aerobias o anaerobias facultativas, tal como los bacilos Gram negativos no fermentadores⁹⁶.

Técnica: Para cada bacteria Gram negativa a identificar, se inoculó por punción dos tubos de medio O/F de Hugh y Leifson. En uno de los dos tubos la superficie se cubrió con parafina estéril para crear condiciones de anaerobiosis. Se incubaron a 37°C 24 horas.

Pruebas de fermentación de hidratos de carbono:

Fermentación de la glucosa y lactosa: En las pruebas de utilización de hidratos de carbono se emplea medio base con rojo de fenol, un solo carbohidrato y un tubo de Durham. Si el microorganismo tiene la capacidad de fermentar los hidratos de carbono se forman ácidos mixtos que disminuyen el pH del medio provocando el viraje del indicador rojo de fenol de color naranja color rojizo (pH neutro) a amarillo (pH ácido). Si además se produce gas, este desplazará el líquido en el tubo de Durham y se observarán burbujas⁹⁸.

Técnica: Con asa de aro se colocó masa bacteriana de bacilos Gram negativos en tubos que contenían; glucosa y lactosa por separados, se incubaron a 37°C durante 24 horas⁹⁶.

Reacción en Agar Kliger (KIA): Es una prueba usada para la fermentación de la glucosa, lactosa, la producción de H₂S y la producción de gas por parte de las bacterias. El cambio de color del indicador rojo de fenol de rojo a amarillo indica fermentación. Si se fermenta únicamente la glucosa el cambio de color del medio ocurre solamente en el fondo del tubo (Taco). Si el microorganismo es capaz de fermentar los dos carbohidratos la glucosa y la lactosa hay cambio de color tanto en la superficie (Bisel) como en el taco. La formación de burbujas que rompen el medio indica presencia de gas como producto final de la fermentación y La producción de H₂S se manifiesta por la aparición de un precipitado color negro debido a la reducción de la sal de hierro presente en el medio⁹⁶.

Técnica: Empleando asa en punta, se inocularon por siembra mixta (Punción y estría) con cepas de bacilos Gram negativos, tubos que contenían Agar Kliger y se incubaron a 37°C por 24 horas⁹⁶.

Reacción en Agar lisina hierro (LIA): Esta prueba es utilizada para determinar la producción de dos enzimas: la lisina descarboxilasa y la lisina desaminasa, además de detectar la producción de H₂S por algunos microorganismos⁹⁶.

Descarboxilación de la lisina: Ocurre en ambiente anaeróbico o sea en el fondo del tubo (Taco) y se pone de manifiesto por la alcalinización del medio que produce el viraje del indicador púrpura de bromocresol. La presencia de glucosa en los componentes del LIA determina primero una reacción de fermentación, produciendo acidificación y cambio de color del medio de púrpura a amarillo. Este pH induce la producción de la enzima lisina descarboxilasa que da lugar a la formación de aminas llamadas cadaverina que alcalizan el medio, lo que resulta en el viraje del indicador de pH nuevamente a púrpura lo que indica que la reacción fue positiva⁹⁸.

Desaminación de la lisina: Ocurre en la parte superior del tubo (Bisel) cuando el microorganismo utiliza las peptonas, esto genera la alcalinización del medio que es el estímulo para la producción de la enzima lisina desaminasa, la cual actúa sobre el aminoácido produciendo ácido α - ketocarboxílico que al combinarse con la sal de hierro y en presencia de oxígeno forma un color violeta rojizo en el bisel, mientras que la parte inferior del tubo se observa amarilla por la fermentación de la glucosa. La producción de H_2S se evidencia por la presencia de un precipitado negro por utilización de las sales de hierro presentes en el medio⁹⁸.

Técnica: Empleando asa en punta, se inocularon por siembra mixta (Punción y estría) con cepas de bacilos Gram negativos, tubos que contenían lisina hierro y se incubaron a 37°C por 24 horas⁹⁶.

Prueba de utilización del citrato de Simmons: El citrato de sodio es una sal del ácido cítrico, un compuesto simple que es uno de los metabolitos producidos en el ciclo de Krebs. Algunas bacterias pueden utilizar el citrato como única fuente de carbono para su crecimiento. Generalmente, los medios de cultivos empleados para la prueba de utilización del citrato contienen citrato de sodio como única fuente de carbono, y fosfato de amonio como única fuente de nitrógeno. Las bacterias que utilizan el citrato también pueden utilizar el amonio como fuente de nitrógeno, lo que resulta en la producción de amoníaco (NH_3^+) y la alcalinización del medio por la conversión del (NH_3^+) en hidróxido de amonio (NH_4OH) que produce el viraje del indicador azul de bromotimol de verde a azul. Si el microorganismo no utiliza el citrato no se produce cambio de color en el medio este permanece verde⁹⁸.

Técnica: Utilizando asa en punta, se inocularon tubos que contenían Agar citrato realizando siembra por estría con cepas de bacilos Gram negativos y se incubaron a 37°C por 24 horas⁹⁶.

Prueba de motilidad: esta prueba se realiza en un medio semisólido permite determinar la capacidad de movimiento por parte de un microorganismo. Los microorganismos móviles muestran un crecimiento difuso o turbidez extendido en

el agar a lo largo de la línea de inoculación. Los microorganismos inmóviles solo crecen a lo largo de la línea de inoculación⁹⁶.

Técnica: Con un asa en punta se tocaron las colonias de las bacterias Gram negativas a estudiar, luego se inocularon por punción tubos con agar semisólido con una profundidad de 1,25 cm y se incubaron a 37°C durante 48 horas⁹⁶.

Prueba de reducción de nitrato: algunos microorganismos tienen la capacidad de utilizar el nitrato como compuesto aceptor de electrones y así reducir el nitrato (NO_3^-) hasta nitrito (NO_2^-). Mientras que otros microorganismos son capaces de reducir el nitrato hasta nitrógeno gaseoso y otros compuestos⁹⁶. Esta reacción se conoce como desnitrificación. La presencia de nitritos en el medio de cultivo se detecta agregando los reactivos α – naftilamina y ácido sulfanílico la formación de un color rojo indica un resultado positivo la reducción de nitrato. Si por el contrario no hay desarrollo de color, pueden haber ocurrido dos cosas: que no se haya reducido el nitrato a nitrito o que el nitrito haya sido reducido a otros compuestos, tales como, amoníaco (NH_3), óxido nítrico (NO), óxido nitroso (N_2O) y nitrógeno molecular (N_2), en este caso a los tubos negativos de los agrega una pequeña cantidad de polvo de Zinc, si se observa la formación de un color rojo el resultado es negativo, pero si la solución permanece incolora el resultado es positivo para la prueba de reducción de nitratos. Por otra parte si se observa desplazamiento del líquido en el tubo de Durham el nitrato se redujo a nitrógeno molecular⁹⁸.

Técnica: Con asa en aro se transfirió a los tubos que contenían caldo nitrado, una porción de los cultivos puros de los bacilos Gram negativos a evaluar y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Luego se les agregó a los tubos de ensayo los reactivos α – naftilamina, ácido sulfanílico y en algunos casos polvo de zinc⁹⁸.

Identificación de las bacterias Gram negativas no fermentadoras (BGNNF): se realizó empleando el sistema de identificación API 20NE© siguiendo las recomendaciones de la casa comercial.

Prueba catalasa: La catalasa es una enzima que poseen la mayoría de las bacterias aerobias, la cual descompone el peróxido de hidrógeno en agua y

oxígeno. El desprendimiento de burbujas procedentes del oxígeno indica que la prueba es positiva⁹⁶.

Técnica: En un portaobjetos se colocó una pequeña porción del cultivo bacteriano de cocos Gram positivos y se añadió unas gotas de H₂O₂ al 3% v/v⁹⁶.

Prueba de la coagulasa en tubo: Esta prueba se realiza para determinar la capacidad de un microorganismo de coagular el plasma por la acción de la enzima coagulasa. La coagulasa es una enzima similar la protombina y es capaz de convertir el fibrinógeno en fibrina, lo cual resulta en la formación de un cuagulo visible a simple vista⁹⁶. Esta prueba se utiliza para diferenciar especies de género *Staphylococcus*, específicamente *Staphylococcus aureus* (coagulasa positiva) del resto de las especies coagulasa negativa⁹⁸.

Técnica: Las cepas de cocos Gram positivos se sembraron en caldo nutriente. De este caldo se tomaron 0,5 mL que se adicionaron en tubos de ensayo que contenían plasma y se incubaron a 37°C durante 24 horas⁹⁷.

Fermentación del Agar manitol salado: La alta concentración de cloruro de sodio resulta en una inhibición total o parcial de microorganismos no pertenecientes al género *Staphylococcus*. La fermentación del manitol es evidenciada por el cambio de color del indicador rojo fenol a amarillo, lo que permite la diferenciación de las especies de este género³³.

Técnica: Empleando asa de aro se tomó material de los cultivos puros de cocos Gram negativos aislados y se sembraron en la superficie del medio de cultivo. Las placas se incubaron a 37°C por 24 horas⁹⁸.

En la tabla 2 se resumen las pruebas empleadas para la identificación bacilos Gram negativos no fermentadores y en la tabla 3 las pruebas utilizadas para los de los cocos Gram positivas.

Tabla 2. Pruebas de identificación para bacilos Gram negativos no fermentadores

Pruebas
Tinción de Gram
Prueba Oxidasa
Prueba de Hugh y Leifson oxidación fermentación (O/F).
Fermentación de la glucosa
Fermentación de la lactosa.
Reacción en Agar Kliger (KIA).
Reacción en Agar lisina hierro (LIA)
Uso del citrato de Simmons.
Prueba de motilidad.
Reducción de nitratos
API [®] 20NE

Fuente: MacFaddin, J. (2003).

Tabla 3 Pruebas para la identificación de cocos Gram positivos

Pruebas
Tinción de Gram
Prueba catalasa
Prueba de la coagulasa.
Fermentación del manitol salado

Fuente: MacFaddin, J. (2003).

3.3.3.3. Determinación de la actividad antimicrobiana y antifúngica de las bacterias heterótrofas viables mesófilas aisladas

Este ensayo se realizó por el método de difusión en agar⁹⁹. El cual consistió en adicionar en placas de Petri estéril 15 mL de agar (MH) (agar base) se dejó solidificar, sobre este se colocaron tres cilindros de acero inoxidable de 7 mm de diámetro y se adicionó 5 mL de agar (MH) previamente inoculado con 100 µL de solución equivalente a $1,5 \times 10^8$ UFC/ mL correspondiendo al 0,5 en la escala de McFarland de las cepas ATCC a evaluar. Luego de 30 minutos se retiraron los cilindros para obtener los pozos en los cuales se colocó 20 µL de solución 0,5 MacFarland preparadas con cada uno de las cepas aisladas. Transcurrido 30 minutos las placas de incubaron a 37°C por 24 a 96 horas.

Para la determinación de la actividad antifúngica se procedió de igual forma con la diferencia que este se dejó incubar las placas a temperatura ambiente por un periodo de 5 días.

La actividad antibacteriana y antifúngica fue medida en función del diámetro del halo de inhibición del crecimiento de las cepas ATCC alrededor de los pozos.

Las cepas utilizadas como controles fueron:

Pseudomonas aeruginosa ATCC27853, *Escherichia coli* ATCC25922, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Escherichia coli* ATCC25972, *Staphylococcus aureus* ATCC29213, *Klitsellia pneumoniae* ATCC23352 y el hongo filamentoso *Aspergillus niger*.

3.3.3.4. Detección de microorganismos con actividades enzimáticas: amilolíticas, proteolíticas, celulolíticas amonificantes, y lipolíticas.

Microorganismos amilolíticos

La detección de microorganismos amilolíticos, se realizó utilizando asa en aro para transferir masa bacteriana de los cultivos frescos de las cepas a los tubos que contenían 9 mL de medio almidón, estos fueron incubados a 37°C por 15 días¹⁰⁰.

Los tubos fueron observados a lo largo de los días tomando 0.3 mL del medio en un tubo de ensayo, se le añadió 2 gotas de solución de yodo-yodurada y 1 mL de agua destilada. Se consideró reacción positiva la aparición de una coloración amarillo ámbar y un resultado negativo una coloración azul¹⁰⁰.

Microorganismos proteolíticos

La determinación de microorganismos con actividad proteolítica se realizó por punción en medio gelatina. Los tubos se incubaron a 37°C por 15 días junto con un tubo no inoculado (tubo testigo)⁹⁶.

Los tubos fueron observados todos los días para observar si había ocurrido licuefacción de la gelatina, para esto los tubos eran refrigerado por 2 horas. Se

consideró positiva la prueba en los tubos donde no ocurrió la solidificación del medio⁹⁶.

Microorganismos celulolíticos

El estudio de microorganismos celulolíticos se realizó inoculando tubos que contenían 9 mL de medio celulosa (fuente de celulosa tira de papel de filtro sumergida dos tercios de solución de Winogradsky). Los tubos se incubaron a 37°C durante 15 días¹⁰¹.

Los tubos se observaron todos los días. La aparición de manchas o rupturas en las tiras de papel indico resultado positivo para actividad celulolítica¹⁰¹.

Microorganismos lipolíticos

La actividad lipolítica se evaluó tomando porciones de los cultivos bacterianos previamente aislados, los cuales fueron estriados en placas de Petri con Agar BP y se incubaron a 37°C por 24 a 96 horas. La aparición de halos de brillantes aceitoso e iridiscente alrededor de las colonias indico un resultado positivo para la actividad lipolítica¹⁰².

Microorganismos amonificantes

La detección de microorganismos amonificantes, se realizó inoculando con cultivos frescos de las cepas aisladas tubos que contenían 9 mL de medio asparagina. Los tubos se incubaron a 37°C durante 15 días¹⁰⁰.

Los tubos se observaron a lo largo de los días, tomando 0,3 mL en un tubo de ensayo y añadiendo 2 gotas del reactivo de Nessler. Se considero reacción positiva la aparición de un color amarillo naranja¹⁰⁰.

3.3.3.5. Prueba de susceptibilidad a los antibióticos

Se utilizó el método de Kirby Bauer de difusión en Agar. Placas con agar Miuller Hinton (MH) fueron inoculadas mediante un hisopo estéril utilizando suspensiones con una turbidez 0,5 McFarland de las cepas aisladas. Para la inoculación se

sumergió un hisopo estéril en el cultivo y se eliminó el exceso rotándolo firmemente contra la pared interna del tubo. El hisopo se frotó sobre la superficie del medio de cultivo, esta operación se repitió por tres veces sucesivas, rotando la placa para obtener una dispersión uniforme del inóculo en toda la superficie, se dejó secar el inóculo por 5 minutos y se colocaron los discos de antibióticos sobre el agar mediante pinzas estériles. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas. Se midió el diámetro de inhibición de crecimiento¹⁰³.

Los antibióticos ensayados fueron: Amoxicilina/ácido Clavuránico 30mg, Azetreonam 30mg, ácido Nalidíxico 30mg, Ciprofloxacina 30mg, Gentamicina 10mg, Amikacina 30mg, Piperacilina 30mg, Cefepima 30mg.

www.bdigital.ula.ve

Capítulo 4. Resultados

www.bdigital.ula.ve

4. Resultados

4.1. Determinación temperatura y pH

Se determinó que la temperatura registrada para la muestra tomada de la naciente del afluente termal El Ron, ubicado en Santa Apolonia, para el primer muestreo tuvo un valor de 35°C, por el contrario la temperatura registrada en la muestra tomada en la piscina del balneario del mismo afluente fue de 26°C y la respectiva temperatura ambiental fue de 26°C (Tabla 4).

Con respecto a los valores de temperatura para el segundo muestreo en las muestras tomadas en Santa Apolonia, se encontró el mismo valor de 35°C en la muestra MA, por su parte para la muestra MP tuvo una temperatura de 24°C la cual tenía 2°C menos con respecto a la medida del primer muestreo, mientras que la temperatura del ambiente que fue de 25°C (Tabla 4).

Por otro lado los valores de temperatura medidos para las muestras tomadas en el manantial termal La Mitisús en el primer muestreo para la muestra tomada en el afluente (MM1) la temperatura del agua fue 26°C, registrándose también el mismo valor de temperatura para la muestra tomada en la manguera de drenaje (MM2) y el valor de la temperatura del ambiente de 15°C (Tabla 5). Mientras que los valores de temperatura se mantuvieron constantes para el segundo muestreo realizado en 26°C, variando solo la medida de la temperatura ambiental 16°C (Tabla 5).

Para conocer el pH en el cual prosperan los microorganismos en las manantiales termales en estudio, se realizaron medidas de pH en las muestras recolectadas. En función de estas medidas se pudo determinar que las aguas termales de Santa Apolonia tienen un pH ligeramente básico reflejado por los valores medidos alrededor de pH 7 (Tabla 4).

Por otra parte las aguas termales de La Mitisús presentan un pH alcalino con valores de pH entre 8-9 (Tabla 5).

Tabla 4. Parámetros fisicoquímicos medidos del agua del manantial termal en la localidad de Santa Apolonia, estado Mérida.

Muestreo 1 (29/6/13)			Muestreo 2 (13/7/13)		Promedio $\bar{x}$	
Muestras	Temperatura °C	pH	Temperatura °C	pH	Temperatura °C	pH
MA	35	7,68	35	7,70	35	7,69
MP	26	7,93	24	7,87	25	7,90
Ambiente	26	-	25	-	25,50	-

MA: muestra tomada en el afluente termal de Santa Apolonia sector el Ron

MP: muestra tomada en la piscina del balneario el Ron en Santa Apolonia

Tabla 5. Parámetros fisicoquímicos medidos del agua del manantial termal en la localidad de La Mitisús, estado Mérida.

Muestreo 1(6/7/13)			Muestreo 2 (20/7/13)		Promedio $\bar{x}$	
Muestras	Temperatura °C	pH	Temperatura °C	pH	Temperatura °C	pH
MM1	26	8,10	26	8,12	26	8,11
MM2	26	9,20	26	9,19	26	9,20
Ambiente	15	-	16	-	15,50	-

MM1: muestra tomada en el afluente termal de La Mitisús.

MM2: muestra tomada en la manguera que drena el manantial termal de La Mitisús a la orilla de la carretera trasandina.

4.2. Análisis microbiológico de las aguas termales La Mitisús y Santa Apolonia.

4.2.1. Aislamiento de bacterias heterótrofas viables aerobias mesófilas.

Transcurrido el período de incubación, se observaron las placas inoculadas con las muestras MM1 proveniente de la naciente del manantial termal La Mitisús, MM2 muestra tomada en la manguera de drenaje del manantial termal La Mitisús, MA muestra procedente de la naciente del manantial termal de Santa Apolonia y MP muestra captada en la piscina del afluente termal de Santa Apolonia, todos ellos para el primer y segundo muestreo.

Dado que en todas las placas se obtuvieron crecimiento confluyente, sobre la superficie del filtro; para la contabilización de los microorganismos presentes se siguió el procedimiento sugerido por la APHA (1992), donde se realiza una estimación suponiendo que en 1 cm² crecen un máximo de 100 colonias, lo cual se relaciona con el área del filtro utilizado. Para cada una de las placas inoculadas con las muestras, se obtuvo que por cada 1 mL de muestra se tiene >16 unidades formadoras de colonias (UFC).

Las diferentes colonias obtenidas de los manantiales estudiados presentaron varias pigmentaciones principalmente colonias con coloraciones amarillas y naranjas, también se obtuvieron colonias con pigmentaciones blancas, verdes y crema.

Se obtuvo un total de 21 cepas aisladas de los dos muestreos realizados, de la cuales nueve (42,86%) pertenecen a las muestras tomadas en la localidad de Santa Apolonia, constituidas a su vez por siete (77,77%) de las cepas aisladas en el primer muestreo y dos (22,22%) aislados del segundo muestreo. Por su parte 12 (57,14%) de las 21 colonias aisladas fueron obtenidas de las muestras tomadas en la localidad de La Mitisús, conformadas por cinco (41,66%) cepas obtenidas en el primer muestreo y siete (58,33%) pertenecientes al segundo muestreo (Tabla 6), (Figura 3).

Tabla 6. Colonias bacterianas aisladas en las muestras de agua de los manantiales de Santa Apolonia y La Mitisús.

Localidad	Muestreo	Cepas aisladas por muestreo	Cepas totales aisladas por localidad	Porcentaje cepas aisladas por muestreo (%)	Porcentaje total cepas aisladas por localidad (%)
Santa Apolonia	1	7	9	77,77	42,86
	2	2		22,22	
La Mitisús	1	5	12	41,66	57,14
	2	7		58,33	
Total cepas aisladas en el estudio		21			

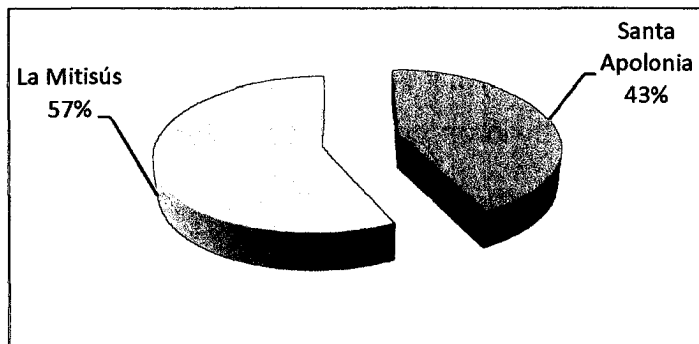


Figura 3. Distribución porcentual de colonias bacterianas aisladas en el agua de los manantiales termales de Santa Apolonia y La Mitisús, estado Mérida.

4.2.1. Identificación de bacterias heterótrofas viables aerobias mesófilas aisladas en las aguas de los manantiales termales de Santa Apolonia y La Mitisús, estado Mérida.

A cada una de las 21 cepas aisladas se les realizó tinción de Gram para observar la morfología y la propiedad tintorial al microscopio, para poder clasificarlos como bacterias Gram positivas o Gram negativas

Los resultados obtenidos reflejan que de las siete cepas aisladas en el primer muestreo en la localidad de Santa Apolonia, seis (85,71%) fueron bacterias Gram negativas, de los cuales cinco (71,43%) de los aislados fueron bacilos Gram negativos y uno (14,23%) de dichos aislados fue un cocobacilo Gram negativo. Por otra parte de las siete cepas aisladas en el manantial antes mencionado, se obtuvo una (14,23%) colonia cocos Gram positiva (Tabla 7).

Mientras que para el segundo muestreo los dos aislados obtenidos fueron bacilos Gram negativos que representaron el 100% de las cepas aisladas en las muestras de agua tomadas en Santa Apolonia para este muestreo (Tabla 7).

En forma global para los dos muestreos realizados en la localidad de Santa Apolonia, el número total de bacterias Gram negativas halladas fueron 8 lo que conforma el 88.88% de las cepas aisladas y una bacteria Gram positivas que representaron el 11,11% del estudio realizado (Figura 4).

Con respecto a las muestras tomadas en La Mitisús para el primer muestreo donde se aislaron cinco cepas, se encontró que cuatro (80%) de los aislados fueron bacilos Gram negativos y uno (20%) cocos Gram positivos (Tabla 7).

Por otra parte para el segundo muestreo se obtuvieron siete aislados en la localidad de La Mitisús, de los cuales seis (85,71%) de los aislados resultaron ser bacilos Gram negativos y uno (14,23%) cocos Gram positivos (Tabla 7).

En resumen para la localidad de La Mitisús en los dos muestreos realizados, el número total de bacterias Gram negativas halladas fueron 10 (83,33%) de las cepas aisladas y solo dos bacterias Gram positivas que representaron el 16,66% del análisis realizado en esta localidad (Figura 5).

Tabla 7. Morfología y propiedad tintorial de las cepas encontradas en los manantiales termales de Santa Apolonia y la Mitisús, estado Mérida

Localidad	Muestreo	Codigos	Tinción	Morfología	Porcentaje (%) cepas	
					Tinción	Morfología
Santa Apolonia	1	MA-MK2	Gram -	Bacilos	85,71	71,43
		MA-BHI	Gram -	Bacilos		
		MP-PC	Gram -	Bacilos		
		MA-EAM	Gram -	Bacilos		
		MA-MK0	Gram -	Bacilos		
		MA-PC	Gram -	Coco-Bacilos		14,29
		MA-BP	Gram +	Cocos	14,29	
	2	MP-MK1	Gram -	Bacilos	100	100
		MA-PC/C	Gram -	Bacilos		
La Mitisús	1	MM2-PC2	Gram +	Cocos	20	20
		MM1-R2A	Gram -	Bacilos	80	80
		MM2-EAM	Gram -	Bacilos		
		MM1-Sg1	Gram -	Bacilos		
		MM2-BHI	Gram -	Bacilos		
	2	MM2-R2A1	Gram-	Bacilos	85,71	85,71
		MM2-R2A0	Gram-	Bacilos		
		MM1-Sg0	Gram-	Bacilos		
		MM2-BHI	Gram-	Bacilos		
		MM1-MK0	Gram-	Bacilos		
		MM1-MK1	Gram -	Bacilos		
		MM1-Ms	Gram +	Cocos	14,29	14,29

Localidad

MA: muestra tomada en la naciente del afluente termal de Santa Apolonia sector el Ron,

MP: muestra tomada en la piscina del balneario el Ron en Santa Apolonia.

MM1: muestra tomada en la naciente del afluente termal de La Mitisús.

MM2: muestra tomada en la manguera que drena el manantial termal de La Mitisús a la orilla de la carretera trasandina.

Las siglas que forman el código de las cepas corresponden al nombre del Agar donde se aislaron.

Los números 0, 1, 2 son la numeración de las placas.

Ejemplo:

MA-MK2= muestra tomada en el afluente termal de Santa Apolonia sector el Ron, aislada en Agar McConkey (MK) placa 2.

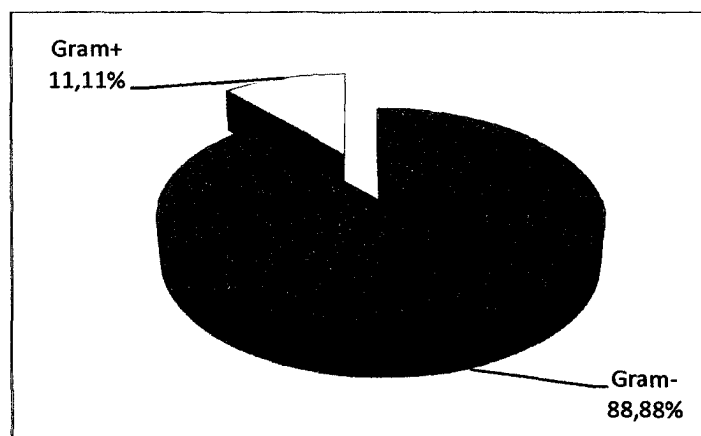


Figura 4. Distribución Porcentual de bacterias Gram negativas y Gram positivas presentes en el agua del manantial termal de Santa Apolonia, estado Mérida.

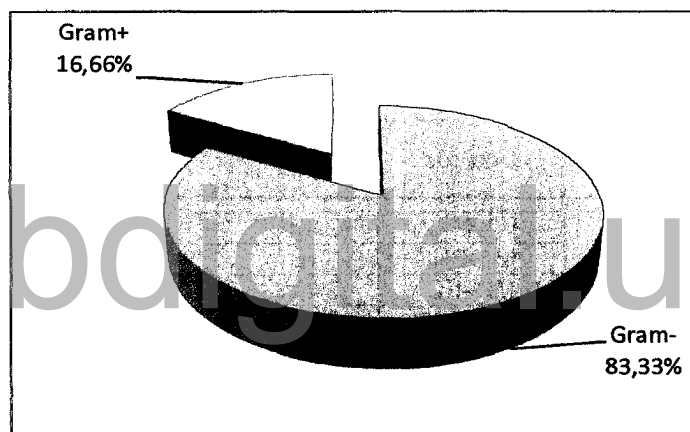


Figura 5. Distribución Porcentual de bacterias Gram negativas y Gram positivas presentes en el agua del manantial termal de La Mitisús, estado Mérida.

Considerando los datos obtenidos en las pruebas bioquímicas aplicadas a los bacilos Gram negativos aislados (tabla 8 y 9), se determinó que las cepas aisladas tienen un metabolismo no fermentativo por lo que se decidió realizar la prueba comercial API® 20 NE, para identificar el género y especie de los aislados.

Tabla 8. Pruebas bioquímicas de las cepas aisladas del manantial termal de La Mitisús.

Pruebas	Catalasa	Oxidasa	Hugh Leifsonn		Fermentación Glucosa	Reacción Agar Kligler	Agar Lisina Hierro	Citrato	Fermentación Lactosa	Cuagulasa	Motilidad	Reducción Nitratos	Fermentación Manitol Salado	Crecimiento MacConkey
Cepas			O	F										
MM1-R2A	N/A	+	-	-	-	- / -	+	+	-	N/A	+	+	N/A	+
MM2-EAM	N/A	+	-	-	-	- / -	+	+	-	N/A	+	+	N/A	+
MM1-Sg1	N/A	+	-	-	-	- / -	+	+	-	N/A	+	+	N/A	+
MM2-BHI	N/A	+	-	-	-	- / -	+	+	-	N/A	+	+	N/A	+
MM2-R2A1	N/A	+	-	-	-	- / -	-	-	-	N/A	+	+	N/A	+
MM2-R2A0	N/A	+	-	-	-	- / -	-	+	-	N/A	+	+	N/A	+
MM1-MK1	N/A	+	+	-	-	- / -	+	+	-	N/A	+	+	N/A	+
MM1-Sg0	N/A	+	-	-	-	- / -	+	+	-	N/A	-	+	N/A	+
MM1-MK0	N/A	+	-	-	-	- / -	+	+	-	N/A	-	+	N/A	+
MM2 ₂ -BHI	N/A	+	-	-	-	- / -	+	+	-	N/A	-	+	N/A	+
MM2-PC2	+	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	-	N/A	N/A	-	N/A
MM1-Ms	+	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	-	N/A	N/A	-	N/A

Localidad

MA: muestra tomada en la naciente del afluente termal de Santa Apolonia sector el Ron,

MP: muestra tomada en la piscina del balneario el Ron en Santa Apolonia.

MM1: muestra tomada en la naciente del afluente termal de La Mitisús.

MM2: muestra tomada en la manguera que drena el manantial termal de La Mitisús a la orilla de la carretera trasandina.

Las siglas que forman el código de las cepas corresponden al nombre del Agar donde se aislaron.

Los números 0, 1, 2 son la numeración de las placas.

Ejemplo:

MA-MK2= muestra tomada en el afluente termal de Santa Apolonia sector el Ron, aislada en Agar MacConkey (MK) placa 2.

Tabla 9. Pruebas bioquímicas de las cepas aisladas del manantial termal de Santa Apolonia.

Pruebas	Catalasa	Oxidasa	Hugh Leifsonn		Fermentación Glucosa	Reacción Agar Kliger	Agar Lisina Hierro	Citrato	Fermentación Lactosa	Cuagulasa	Motilidad	Reducción Nitratos	Fermentación Manitol Salado	Crecimiento MacConkey
			O	F										
MA-MK2	N/A	+	+	-	-	-	+	+	-	N/A	-	+	N/A	+
MA-BHI	N/A	+	+	-	-	-	+	-	-	N/A	-	-	N/A	+
MP-PC	N/A	+	+	-	-	-	+	+	-	N/A	+	+	N/A	+
MA-MK0	N/A	+	+	-	-	-	+	+	-	N/A	+	+	N/A	+
MA-EAM	N/A	+	+	-	-	-	-	+	-	N/A	+	+	N/A	+
MA-PC	N/A	+	+	-	-	-	+	+	-	N/A	-	+	N/A	+
MA-BP	+	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	-	N/A	N/A	-	N/A
MP-MK1	N/A	+	-	-	-	-	+	+	-	N/A	-	+	N/A	+
MA-PC/C	N/A	+	+	-	-	-	+	+	-	N/A	-	+	N/A	+

Localidad

MA: muestra tomada en la naciente del afluente termal de Santa Apolonia sector el Ron,

MP: muestra tomada en la piscina del balneario el Ron en Santa Apolonia.

MM1: muestra tomada en la naciente del afluente termal de La Mitisús.

MM2: muestra tomada en la manguera que drena el manantial termal de La Mitisús a la orilla de la carretera trasandina.

Las siglas que forman el código de las cepas corresponden al nombre del Agar donde se aislaron.

Los números 0, 1, 2 son la numeración de las placas.

Ejemplo:

MA-MK2= muestra tomada en el afluente termal de Santa Apolonia sector el Ron, aislada en Agar McConkey (MK) placa 2.

Las tres cepas Gram positivas aisladas de las muestras de agua tomadas en los manantiales termales la Mitisús y Santa Apolonia, se identificaron solo a nivel de género, gracias al uso de las pruebas bioquímicas (tablas 8 y 9).

A partir de los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas (tablas 8 y 9) y las pruebas comerciales API® 20 NE (tabla 10 y 11), se logró identificar el género y especie de 18 bacterias Gram negativas de las muestras de agua tomadas en los manantiales termales la Mitisús y Santa Apolonia.

Tabla 10. Resultados API® 20 NE para las cepas aisladas del manantial termal de La Mitisús.

Cepas	MM1-R2A	MM2-EAM	MM1-Sg1	MM2-BHI	MM2-R2A1	MM2-R2A0	MM1-MK1	MM1-Sg0	MM1-MK0	MM2 ₂ -BHI
Pruebas										
Reducción de Nitratos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Formación de Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fermentación Glucosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arginina DiHidrolasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UREasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hidrólisis (β-Glucosida)	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Hidrólisis (proteasa(GELatina))	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+
β-galactosidasa (p-NitroFenil-βD-Galactopiranosidasa)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Asimilación (GLUcosa)	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Asimilación (ARAbinosa)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Asimilación (MaNosA)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Asimilación (MANitol)	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Asimilación (N-Acetil-Glucosamina)	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Asimilación (MALtosa)	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Asimilación (GlucoNaTo potásico)	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Asimilación (ácido CAPrico)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Asimilación (ácido ADIpico)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Asimilación (MaLTa)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Asimilación (CITrato tr)isódico	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Asimilación (ácido fenilACético)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxidasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Localidad

MA: muestra tomada en la naciente del afluente termal de Santa Apolonia sector el Ron,

MP: muestra tomada en la piscina del balneario el Ron en Santa Apolonia.

MM1: muestra tomada en la naciente del afluente termal de La Mitisús.

MM2: muestra tomada en la manquera que drena el manantial termal de La Mitisús a la orilla de la carretera trasandina.

Las siglas que forman el código de las cepas corresponden al nombre del Agar donde se aislaron.

Los números 0, 1, 2 son la numeración de las placas.

Ejemplo:

MA-MK2= muestra tomada en el afluente termal de Santa Apolonia sector el Ron, aislada en Agar McConkey (MK) placa 2.

Tabla 11. Resultados API® 20 NE para las cepas aisladas del manantial termal de Santa Apolonia

Cepas	MA-MK2	MA-BHI	MP-PC	MA-MK0	MA-EAM	MA-PC	MP-MK1	MA-PC/C
Pruebas								
Reducción de Nitratos	-	+	+	+	+	+	+	+
Formación de Indol	-	-	-	-	-	-	-	-
Fermentación Glucosa	-	-	-	-	-	-	-	-
Arginina DiHidrolasa	-	+	-	+	+	+	-	+
UREasa	-	-	-	-	-	+	-	+
Hidrólisis (β -Glucosida)	-	-	-	-	-	-	-	-
Hidrólisis (proteasa(GELatina))	+	+	+	+	+	+	-	+
β -galactosidasa (p-NitroFenil- β D-Galactopiranosidasa)	-	-	-	-	-	-	-	-
Asimilación (GLUcosa)	+	+	+	+	+	+	+	+
Asimilación (ARAbinosa)	-	+	+	+	+	+	-	-
Asimilación (MaNosA)	-	+	+	+	+	+	-	-
Asimilación (MANitol)	+	+	+	+	+	+	+	+
Asimilación (N-Acetil-Glucosamina)	+	+	+	+	+	+	+	+
Asimilación (MALtosa)	+	+	+	+	+	+	+	-
Asimilación (GlucoNaTo potásico)	+	+	+	+	+	+	+	+
Asimilación (ácido CAPrico)	+	+	+	+	+	+	+	+
Asimilación (ácido ADIpico)	-	+	-	+	-	+	+	+
Asimilación (MaLTa)	+	+	+	+	+	+	+	+
Asimilación (CITrato triisódico)	+	+	+	+	+	+	+	+
Asimilación (ácido fenilACético)	+	+	+	+	+	-	+	-
Oxidasa	+	+	+	+	+	+	+	+

Localidad

MA: muestra tomada en la naciente del afluente termal de Santa Apolonia sector el Ron,

MP: muestra tomada en la piscina del balneario el Ron en Santa Apolonia.

MM1: muestra tomada en la naciente del afluente termal de La Mitisús.

MM2: muestra tomada en la manguera que drena el manantial termal de La Mitisús a la orilla de la carretera trasandina.

Las siglas que forman el código de las cepas corresponden al nombre del Agar donde se aislaron.

Los números 0, 1, 2 son la numeración de las placas.

Ejemplo:

MA-MK2= muestra tomada en el afluente termal de Santa Apolonia sector el Ron, aislada en Agar McConkey (MK) placa 2.

Para Santa Apolonia en el primer muestreo se obtuvieron siete aislados de los cuales cuatro (57,14%) pertenecieron al género *Burkholderia*, dos (28,57%) al género *Pseudomonas* y uno (14,29%) al género *Staphylococcus* (Tabla 12).

En el segundo muestreo realizado en Santa Apolonia se aislaron dos bacilos Gram negativos uno (50%) del género *Burkholderia* y uno (50%) del género *Pseudomonas* (Tabla 12).

Para los dos muestreos realizados el género *Burkholderia* fue el que se encontró con mayor frecuencia con un 55,55% en las muestras de aguas termales de Santa Apolonia, seguida por un 33,33% del género *Pseudomonas* y finalmente un 11,11% representado por el género *Staphylococcus* (Figura 6).

Con respecto a los géneros presentes para el primer muestreo en las muestras de La Mitisús donde se obtuvieron cinco aislados, se encontró que cuatro (80%) resultaron ser del género *Comamonas* y uno (20%) perteneció al género *Staphylococcus* (Tabla 13).

Para el segundo muestreo realizado en La Mitisús se aislaron siete cepas bacterianas, de las cuales tres (42,86%) son del género *Comamonas* y las cuatro restantes pertenecieron a cuatro géneros diferentes entre los cuales se observaron: *Ralstonia*, *Pseudomonas*, *Shewanella* y *Staphylococcus* representando cada uno el 14,28% de los géneros hallados (Tabla 12).

En forma global para las muestras de agua recolectadas en ambos muestreos en la Mitisús, se tuvo que el género *Comamonas* fue el de mayor frecuencia con un 58,33%, seguido por un 16,66% del género *Staphylococcus* y finalmente los géneros *Ralstonia*, *Pseudomonas*, *Shewanella* presentando un 8,33% respectivamente de los géneros determinados (Figura 7).

Tabla 12. Géneros de las colonias aisladas de los manantiales termales La Mitisús y Santa Apolonia, estado Mérida.

Localidad	Muestreo	Cepas	Géneros	Total de géneros encontrados por muestreo	Porcentaje (%)
Santa Apolonia	1	MA-MK2	<i>Burkholderia</i>	4	57,14
		MA-BHI			
		MP-PC			
		MA-MK0	<i>Pseudomonas</i>	2	28,57
		MA-EAM			
		MA-PC	<i>Staphylococcus</i>	1	14,28
		MA-BP			
	2	MP-MK1	<i>Burkholderia</i>	1	50,00
		MA-PC/C	<i>Pseudomonas</i>	1	50,00
La Mitisús	1	MM2-PC2	<i>Staphylococcus</i>	1	20,00
		MM1-R2A	<i>Comamonas</i>	4	80,00
		MM2-EAM			
		MM1-Sg1			
		MM2-BHI			
	2	MM2-R2A1	<i>Ralstonia</i>	1	14,28
		MM2-R2A0	<i>Pseudomonas</i>	1	14,28
		MM1-MK1	<i>Shewanella</i>	1	14,28
		MM1-Ms	<i>Staphylococcus</i>	1	14,28
		MM1-Sg0	<i>Comamonas</i>	3	42,86
		MM1-MK0			
		MM2-BHI			

Localidad

MA: muestra tomada en la naciente del afluente termal de Santa Apolonia sector el Ron,

MP: muestra tomada en la piscina del balneario el Ron en Santa Apolonia.

MM1: muestra tomada en la naciente del afluente termal de La Mitisús.

MM2: muestra tomada en la manguera que drena el manantial termal de La Mitisús a la orilla de la carretera trasandina.

Las siglas que forman el código de las cepas corresponden al nombre del Agar donde se aislaron.

Los números 0, 1, 2 son la numeración de las placas.

Ejemplo:

MA-MK2= muestra tomada en el afluente termal de Santa Apolonia sector el Ron, aislada en Agar McConkey (MK) placa 2.

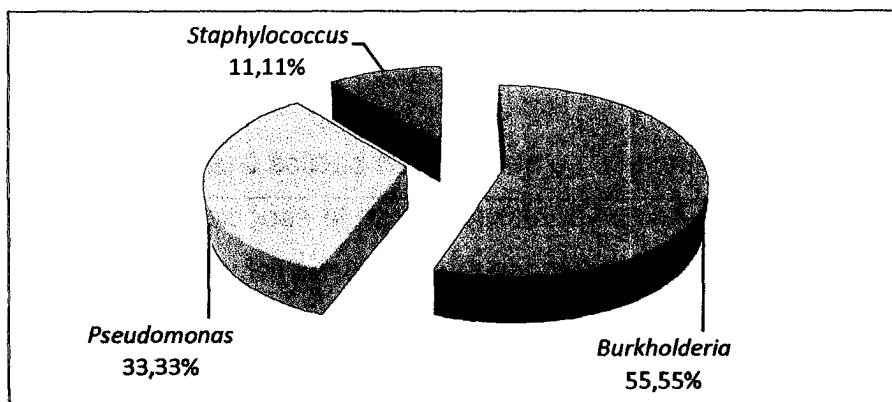


Figura 6. Distribución porcentual de géneros bacterianos identificados en el agua del manantial termal de Santa Apolonia, estado Mérida.

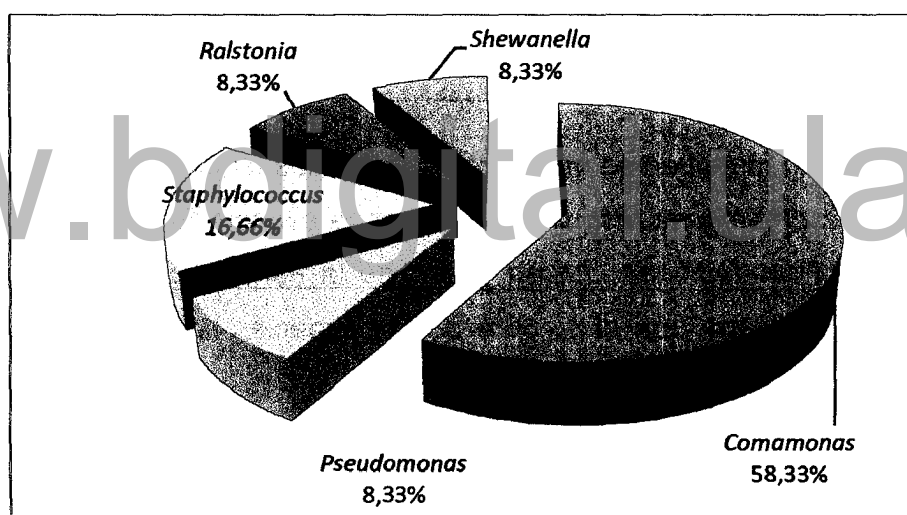


Figura 7. Distribución porcentual de géneros bacterianos identificados en el agua del manantial termal de La Mitisús, estado Mérida.

De los resultados obtenidos en las pruebas comerciales API® 20 NE y las pruebas bioquímicas secundarias, se logró también identificar la especie de las 18 bacterias Gram negativas aisladas de las muestras de agua tomadas en los manantiales termales La Mitisús y Santa Apolonia.

En la localidad de Santa Apolonia para el primer muestreo se aislaron seis bacterias Gram negativas, cuatro (66,66%) pertenecientes a la especie

Burkholderia cepacia y dos (33,33%) de la especie *Pseudomonas fluorescens* (Tabla 13).

Para el segundo muestreo se aislaron dos bacilos Gram negativos de las muestras tomadas en Santa Apolonia, uno (50%) de la especie *Burkholderia cepacia* y otro (50%) de la especie *Pseudomonas aeruginosa* (Tabla 13).

Recapitulando en los dos muestreos realizados en la localidad de Santa Apolonia la especie *Burkholderia cepacia* fue la de mayor frecuencia con un 62,5%, seguida por un 25% de la especie *Pseudomonas fluorescens* y por ultimo 12,5% representado por la especie *Pseudomonas aeruginosa* (Figura 8).

Por su parte en las muestras de aguas tomadas en La Mitisús se aislaron cuatro bacterias Gram negativas todas pertenecientes a la especie *Comamonas testosteroni*, lo que representa el 100% de las especies encontradas para el primer muestreo (Tabla 13).

En el segundo muestreo se obtuvieron seis bacilos Gram negativos, tres (50%) de la especie *Comamonas testosteroni*, uno de la especie *Ralstonia pickettii*, otro de la especie *Pseudomonas stutzeri* y uno de la especie *Shewanella putrefaciens* representando cada una el 16,66% de las especies halladas en este muestreo (Tabla 13).

Para los dos muestreos realizados en la localidad de La Mitisús la especie encontrada con mayor frecuencia fue *Comamonas testosteroni* con un 70%, seguido por las especies *Ralstonia pickettii*, *Pseudomonas stutzeri* y *Shewanella putrefaciens* que representan cada una el 10% de las especies encontradas en esta localidad (Figura 9).

Tabla 13. Especies bacterianas identificadas en el agua de los manantiales termales La Mitisús y Santa Apolonia, estado Mérida.

Localidad	Muestreo	Cepas	Especies	Total de especies encontrados por muestreo	Porcentaje (%)
Santa Apolonia	1	MA-MK2	<i>Burkholderia cepacia</i> .	4	66,66
		MA-BHI			
		MP-PC			
		MA-MK0			
		MA-EAM	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	2	33,3
		MA-PC			
La Mitisús	1	MP-MK1	<i>Burkholderia cepacia</i> .	1	50,00
		MA-PC/C	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	50,00
	2	MM1-R2A	<i>Comamonas testosteroni</i>	4	100
		MM2-EAM			
		MM1-Sg1			
		MM2-BHI			
		MM2-R2A1	<i>Ralstonia pickettii</i>	1	16,66
		MM2-R2A0	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	1	16,66
		MM1-MK1	<i>Shewanella putrefaciens</i>	1	16,66
		MM1-Sg0	<i>Comamonas testosteroni</i>	3	50,00
		MM1-MK0			
		MM2-BHI			

Localidad

MA: muestra tomada en la naciente del afluente termal de Santa Apolonia sector el Ron,

MP: muestra tomada en la piscina del balneario el Ron en Santa Apolonia.

MM1: muestra tomada en la naciente del afluente termal de La Mitisús,

MM2: muestra tomada en la manguera que drena el manantial termal de La Mitisús a la orilla de la carretera trasandina.

Las siglas que forman el código de las cepas corresponden al nombre del Agar donde se aislaron

Los números 0,1, 2 son la numeración de las placas.

Ejemplo:

MA-MK2= muestra tomada en el afluente termal de Santa Apolonia sector el Ron, aislada en Agar McConkey (MK) placa 2.

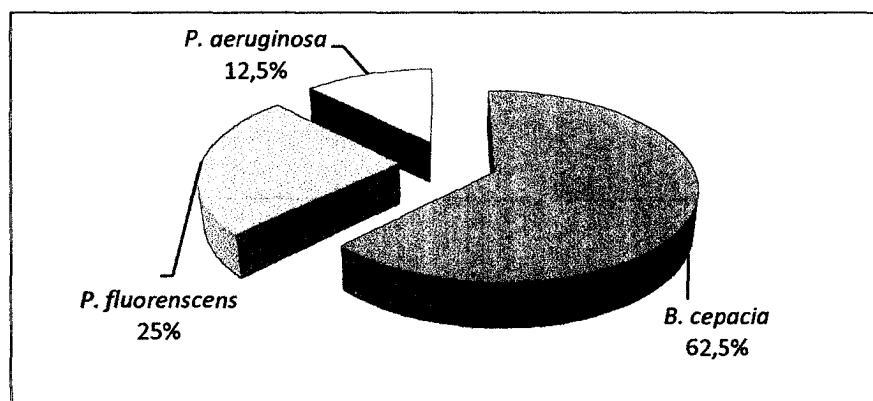


Figura 8. Distribución porcentual de las especies bacterianas identificadas presentes en el agua del manantial termal de Santa Apolonia, estado Mérida.

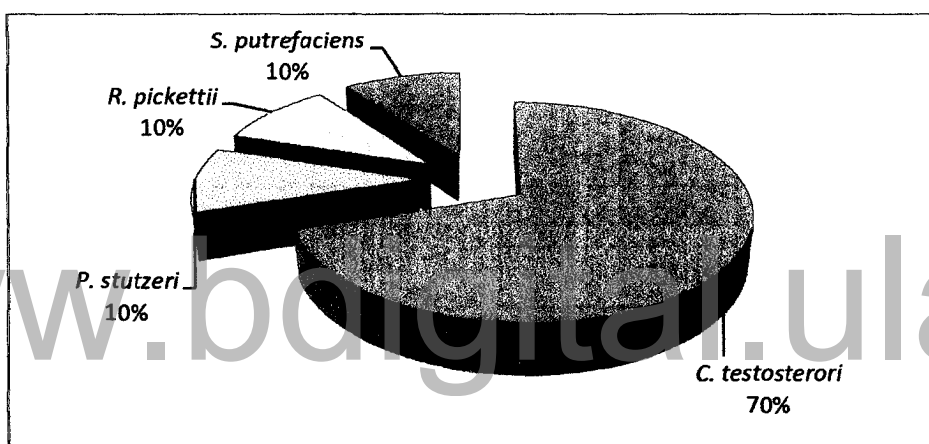


Figura 9. Distribución porcentual de las especies bacterianas identificadas presentes en el agua del manantial termal de La Mitisús, estado Mérida.

Cabe destacar que las tres cepas que no se incluyen en lo anteriormente descrito para las especies encontradas pertenecen al género *Staphylococcus*, los cuales son reportados como *Staphylococcus* coagulasa negativa, debido a su comportamiento en las pruebas bioquímicas respectivas, en las que se observó que estos microorganismos no responden a la formación de coágulo, son catalasa positiva y aunque crecen en agar manitol salado no producen cambio de color en el medio, por lo que se descarta la presencia de *Staphylococcus aureus*.

4.2.3. Determinación de la actividad antimicrobiana y antifúngica de las bacterias heterótrofas viables mesófilas aisladas del agua de los manantiales termales de Santa Apolonia y La Mitisús, estado Mérida.

Las 21 cepas aisladas e identificadas fueron evaluadas por el método de difusión en agar para determinar el potencial antibacteriano y antifúngico contra siete cepas ATCC.

De las nueve cepas aisladas en Santa Apolonia, 8 cepas (88,88%) presentaron actividad antifúngica contra el hongo filamentoso *Aspergillus niger*, las cepas con efecto antagonico fueron de las especies *Burkholderia cepacia* (MA-MK2, MA-BHI, MP-PC, MA-MK0, MP-MK1), *Pseudomonas fluorescens* (MA-EAM, MA-PC) y *Pseudomonas aeruginosa* (MA-PC/C).

De los cepas aisladas con actividad antifúngica, solamente tres (33,33%) presentaron actividad antibacteriana contra bacterias Gram positivas *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Staphylococcus aureus* ATCC29213 y bacterias Gram negativas *Escherichia coli* ATCC25922 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC23352, cabe destacar que las especies con efecto antagonico pertenecieron a las especies *Pseudomonas fluorescens* (MA-EAM, MA-PC) y *Pseudomonas aeruginosa* (MA-PC/C). Adicionalmente se observó que solamente la cepa MA-PC/C de la especie *Pseudomona aeruginosa* presentó actividad antibacteriana contra *Escherichia coli* ATCC25972 (Tablas 14 y 15). Es conveniente mencionar que ninguna de las cepas aisladas presentaron actividad antibacteriana contra la *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853.

Es importante destacar que de las cepas aisladas en el manantila termal La Mitisús, ninguna de ellas presentó actividad antifúngica o antibacteriana contra las especies evaluadas *Aspergillus niger*, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Staphylococcus aureus* ATCC29213, *Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC23352 y *Escherichia coli* 25972.

Tabla 14. Actividad antimicrobiana y antifúngica de las cepas bacterianas aisladas e identificadas procedentes del agua de los manantiales termales La Mitisús y Santa Apolonia, estado Mérida.

Cepas aisladas en el estudio		Halos de cepas evaluadas (mm)						
Cepas	Códigos	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC29213	<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	<i>Escherichia coli</i> ATCC25972	<i>Klebsellia pneumoniae</i> ATCC23352	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	<i>Aspergillus niger</i>
<i>Burkholderia cepacia</i> .	MA-MK2	-	-	-	-	-	-	27
	MA-BHI	-	-	-	-	-	-	23
	MP-PC	-	-	-	-	-	-	16
	MA-MK0	-	-	-	-	-	-	25
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	MA-EAM	10	16	15	-	2	-	16
	MA-PC	13	12	17	-	3	-	30
<i>Staphylococcus</i>	MA-BP	-	-	-	-	-	-	-
<i>Burkholderia cepacia</i>	MP-MK1	-	-	-	-	-	-	23
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MA-PC/C	15	6	14	10	2	-	20
<i>Staphylococcus</i>	MM2-PC2	-	-	-	-	-	-	-
<i>Comamonas testosteroni</i>	MM1-R2A	-	-	-	-	-	-	-
	MM2-EAM	-	-	-	-	-	-	-
	MM1-Sg1	-	-	-	-	-	-	-
	MM2-BHI	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ralstonia pickettii</i>	MM2-R2A1	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	MM2-R2A0	-	-	-	-	-	-	-
<i>Shewanella putrefaciens</i>	MM1-MK1	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus</i>	MM1-Ms	-	-	-	-	-	-	-
<i>Comamonas testosteroni</i>	MM1-Sg0	-	-	-	-	-	-	-
	MM1-MK0	-	-	-	-	-	-	-
	MM2-BHI	-	-	-	-	-	-	-

Localidad
MA: muestra tomada en la naciente del afluente termal de Santa Apolonia sector el Ron.
MP: muestra tomada en la piscina del balneario el Ron en Santa Apolonia.
MM1: muestra tomada en la naciente del afluente termal de La Mitisús.
MM2: muestra tomada en la mancha que drena el manantial termal de La Mitisús a la orilla de la carretera trepanina.
Los siglas que forman el código de las cepas corresponden al nombre del Agar donde se aislaron.
Los números 0, 1, 2 son la numeración de las placas.
Ejemplo:
MA-MK2: muestra tomada en el afluente termal de Santa Apolonia sector el Ron, aislada en Agar McConkey (MK) placa 2.

Tabla 15. Especies bacterianas con actividad antimicrobiana y antifúngica aisladas del agua de los manantiales termales La Mitisús y Santa Apolonia, estado Mérida.

Localidad	Total de cepas aisladas por localidad	Códigos de los aislados	Cepas con actividad antimicrobiana	Total cepas		Porcentaje (%)	
				Af.	Ab.	Af	Ab
Santa Apolonia	9	MA-MK2	Burkholderia cepacia	8	3	88,88	33,33
		MA-BHI					
		MP –PC					
		MA-MK0					
		MP-MK1	Pseudomonas fluorescens				
		MA-EAM					
		MA-PC	Pseudomonas aeruginosa				
		MA-PC/C					

Af= actividad fúngica, Ab= actividad antibacteriana.

MA: muestra tomada en la naciente del afluente termal de Santa Apolonia sector el Ron,

MP: muestra tomada en la piscina del balneario el Ron en Santa Apolonia.

MM1: muestra tomada en la naciente del afluente termal de La Mitisús.

MM2: muestra tomada en la manguera que drena el manantial termal de La Mitisús a la orilla de la carretera trasandina.

Las siglas que forman el código de las cepas corresponden al nombre del Agar donde se aislaron.

Los números 0, 1, 2 son la numeración de las placas.

Ejemplo:

MA-MK2= muestra tomada en el afluente termal de Santa Apolonia sector el Ron, aislada en Agar McConkey (MK) placa 2.

4.2.4. Detección de microorganismos con actividades enzimáticas: amilolíticas, proteolíticas, celulolíticas, amonificantes, y lipolíticas en muestra de agua de los manantiales termales de Santa Apolonia y La Mitisús, estado Mérida, estado Mérida.

Las actividades enzimáticas amilolíticas, proteolíticas, celulolíticas, amonificantes, y lipolíticas, fueron evaluadas para cada una de las 21 cepas aisladas en las muestras de aguas tomadas en las dos localidades estudiadas.

Los resultados obtenidos reflejan que los microorganismos aislados no tienen la capacidad de producir enzimas celulolíticas, lipolíticas y amonificantes. Pero si son capaces de generar enzimas con actividades amilolíticas y proteolíticas. Los resultados de los ensayos realizados se reportan en la tabla 16.

Tabla 16. Actividades enzimáticas de las cepas bacterianas aisladas en el agua de los manantiales termales La Mitisús y Santa Apolonia, estado Mérida.

Cepas aisladas en el estudio		Actividad enzimática evaluada				
Cepas	Códigos	Amilolíticas	Proteolíticas	Celulolíticas	Amonificantes	Lipolíticas
<i>Burkholderia cepacia</i> .	MA-MK2	+	+	-	-	-
	MA-BHI	+	+	-	-	-
	MP-PC	+	-	-	-	-
	MA-MK0	-	+	-	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	MA-EAM	+	+	-	-	-
	MA-PC	+	+	-	-	-
<i>Staphylococcus</i>	MA-BP	-	-	-	-	-
<i>Burkholderia cepacia</i>	MP-MK1	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MA-PC/C	-	+	-	-	-
<i>Staphylococcus</i>	MM2-PC2	-	-	-	-	-
<i>Comamonas testosteroni</i>	MM1-R2A	-	-	-	-	-
	MM2-EAM	-	-	-	-	-
	MM1-Sg1	-	-	-	-	-
	MM2-BHI	-	-	-	-	-
<i>Ralstonia pickettii</i>	MM2-R2A1	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	MM2-R2A0	-	-	-	-	-
<i>Shewanella putrefaciens</i>	MM1-MK1	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus</i>	MM1-Ms	-	-	-	-	-
<i>Comamonas testosteroni</i>	MM1-Sg0	-	-	-	-	-
	MM1-MK0	-	-	-	-	-
	MM2-BHI	-	-	-	-	-

MA: muestra tomada en la naciente del afluente termal de Santa Apolonia sector el Ron,

MP: muestra tomada en la piscina del balneario el Ron en Santa Apolonia.

MM1: muestra tomada en la naciente del afluente termal de La Mitisús.

MM2: muestra tomada en la manguera que drena el manantial termal de La Mitisús a la orilla de la carretera trasandina.

Las siglas que forman el código de las cepas corresponden al nombre del Agar donde se aislaron.

Los números 0, 1, 2 son la numeración de las placas.

Ejemplo:

MA-MK2= muestra tomada en el afluente termal de Santa Apolonia sector el Ron, aislada en Agar McConkey (MK) placa 2.

Microorganismos amilolíticos

De las pruebas para la detección de actividad amilolítica, se obtuvo que de las nueve cepas aisladas en los dos muestreos realizados en Santa Apolonia, cinco de las cepas (55,55%) tuvieron la capacidad de producir enzimas amilolíticas, las cepas con actividad amilolítica fueron de las especies *Burkholderia cepacia* (MA-MK2, MA-BHI, MP-PC) y *Pseudomonas fluorescens* (MA-EAM, MA-PC) (Tabla 17).

Para las 12 cepas aisladas en las muestras de aguas tomadas en la localidad de La Mitusús, ninguno de los aislados presentó actividad amilolítica.

Tabla 17. Especies bacterianas con actividad amilolítica aisladas del agua de los manantiales termales de Santa Apolonia.

Localidad	Total de cepas aisladas por localidad	Códigos de los aislados	Cepas amilolíticas	Total cepas	Porcentaje (%)
Santa Apolonia	9	MA-MK2	<i>Burkholderia Cepacia</i>	5	55,55
		MA-BHI			
		MP-PC			
		MA-EAM	<i>Pseudomonas fluorescens</i>		
		MA-PC			

MA: muestra tomada en la naciente del afluente termal de Santa Apolonia sector el Ron,

MP: muestra tomada en la piscina del balneario el Ron en Santa Apolonia.

MM1: muestra tomada en la naciente del afluente termal de La Mitusús.

MM2: muestra tomada en la manguera que drena el manantial termal de La Mitusús a la orilla de la carretera trasandina.

Las siglas que forman el código de las cepas corresponden al nombre del Agar donde se aislaron.

Los números 0, 1, 2 son la numeración de las placas.

Ejemplo:

MA-MK2= muestra tomada en el afluente termal de Santa Apolonia sector el Ron, aislada en Agar McConkey (MK) placa 2.

Microorganismos proteolíticos

De los ensayos realizados para determinar la actividad proteolítica, se observó que de las nueve cepas aisladas en los dos muestreos realizados en Santa Apolonia, tres especies presentaron actividad proteolítica distribuidas en seis cepas (66,66%); tres cepas de la especie *Burkholderia cepacia* (MA-MK2, MA-BHI,

MA-MK0), dos cepas de la especie de la *Pseudomonas fluorescens* (MA-EAM, MA-PC) y una de la especie *Pseudomonas aeruginosa* (MA-PC/C) (Tabla 18).

Para las 12 cepas aisladas en las muestras de aguas tomadas en la localidad de La Mitusús, ninguno de los aislados presentó actividad proteolítica.

Tabla 18. Especies bacterianas con actividad proteolíticas aisladas del agua de los manantiales termales de Santa Apolonia.

Localidad	Total de cepas aisladas por localidad	Códigos de los aislados	Cepas proteolíticas	Total cepas	Porcentaje (%)
Santa Apolonia	9	MA-MK2	<i>Burkholderia cepacia</i>	6	66,66
		MA-BHI			
		MA-MK0			
		MA-EAM	<i>Pseudomonas fluorescens</i>		
		MA-PC			
		MA-PC/C	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		

MA: muestra tomada en la naciente del afluente termal de Santa Apolonia sector el Ron,

MP: muestra tomada en la piscina del balneario el Ron en Santa Apolonia.

MM1: muestra tomada en la naciente del afluente termal de La Mitusús.

MM2: muestra tomada en la manguera que drena el manantial termal de La Mitusús a la orilla de la carretera trasandina.

Las siglas que forman el código de las cepas corresponden al nombre del Agar donde se aislaron.

Los números 0, 1, 2 son la numeración de las placas.

Ejemplo:

MA-MK2= muestra tomada en el afluente termal de Santa Apolonia sector el Ron, aislada en Agar McConkey (MK) placa 2.

4.2.5. Susceptibilidad a los antibióticos

En la tabla 15 se pueden observar los resultados obtenidos en los ensayos de susceptibilidad a diferentes antibióticos. Se observó que las 18 cepas de bacilos Gram negativos aisladas en ambos manantiales termales, fueron resistentes a la Amoxicilina/ ácido Clavuránico, sin embargo las mismas cepas fueron sensibles a los siete de los ocho antibióticos utilizados (Azetreonam, ácido Nalidixico, Ciprofloxacina, Gentamicina, Amikacina, Piperacilina, Cefepima). Por el contrario, todas las cepas fueron resistentes a la Amoxicilina/ ácido Clavuránico.

Tabla 19. Susceptibilidad a diversos antibióticos de las cepas bacterianas aisladas del agua de los manantiales termales Santa Apolonia y La Mitisús, estado Mérida.

Cepas aisladas en el estudio		Antibióticos							
Especies	Códigos	Amoxicilina/ ácido clavulánico	Aztreonam	Ácido nalidixico	Ciprofloxacina	Gentamicina	Amikacina	Piperacilina	Cefepima
<i>Burkholderia cepacia</i> .	MA-MK2	R	S	S	S	S	S	S	S
	MA-BHI	R	S	S	S	S	S	S	S
	MP-PC	R	S	S	S	S	S	S	S
	MA-MK0	R	S	S	S	S	S	S	S
	MP-MK1	R	S	S	S	S	S	S	S
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	MA-EAM	R	S	S	S	S	S	S	S
	MA-PC	R	S	S	S	S	S	S	S
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MA-PC/C	R	S	S	S	S	S	S	S
<i>Comamonas testosteroni</i>	MM1-R2A	R	S	S	S	S	S	S	S
	MM2-EAM	R	S	S	S	S	S	S	S
	MM1-Sg1	R	S	S	S	S	S	S	S
	MM2-BHI	R	S	S	S	S	S	S	S
	MM1-Sg0	R	S	S	S	S	S	S	S
	MM1-MK0	R	S	S	S	S	S	S	S
	MM2-BHI	R	S	S	S	S	S	S	S
<i>Ralstonia pickettii</i>	MM2-R2A1	R	S	S	S	S	S	S	S
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	MM2-R2A0	R	S	S	S	S	S	S	S
<i>Shewanella putrefaciens</i>	MM1-MK1	R	S	S	S	S	S	S	S

MA: muestra tomada en la naciente del afluente termal de Santa Apolonia sector el Ron,

MP: muestra tomada en la piscina del balneario el Ron en Santa Apolonia.

MM1: muestra tomada en la naciente del afluente termal de La Mitisús.

MM2: muestra tomada en la manguera que drena el manantial termal de La Mitisús a la orilla de la carretera trasandina.

Las siglas que forman el código de las cepas corresponden al nombre del Agar donde se aislaron.

Los números 0, 1, 2 son la numeración de las placas.

Ejemplo:

MA-MK2= muestra tomada en el afluente termal de Santa Apolonia sector el Ron, aislada en Agar McConkey (MK) placa 2.

Capítulo 5.

Discusión, Conclusiones y Recomendaciones

5. Análisis y discusión

5.1. Determinación de temperatura y pH

En la tabla 4 podemos observar que la temperatura promedio del afluente termal de Santa Apolonia fue de 35°C y la temperatura promedio ambiental fue de 25,5°C; es evidente que la temperatura promedio del afluente es 9,5°C superior a la temperatura del ambiente, razón por la cual estas aguas son consideradas aguas termales.

En función de las medidas de temperaturas estas aguas termales también se puede considerar aguas mesotermales, pues la temperatura promedio del afluente es de 35°C. Lo que cumple con el criterio de aguas mesotermales, el cual establece que aguas con temperaturas entre 35°C-45°C son mesotermales²¹.

Se observó que la temperatura del agua la piscina del balneario El Ron es 10°C inferior a la temperatura del agua de la naciente termal. La diferencia de temperatura observada se debe al trayecto que el agua termal recorre desde la naciente hasta la piscina a través de una manguera, la cual atraviesa el cauce del río el Rón. Es importante destacar que aunque la temperatura del agua de la piscina por factores externos no cumple con el criterio de agua termal, evidentemente la misma es de origen termal ya que la temperatura del afluente del que proviene es 9,5°C superior a la temperatura del medio ambiente.

Este criterio de termalidad ha sido implementado por autores como De la Rosa y col. los cuales han analizado una amplia variedad de manantiales termales en España. Entre estos se encuentran los estudios realizados en el manantial mesotermal Puente Viesgo, donde observaron que la temperatura del afluente fue de 35°C¹⁰⁴. El mismo criterio fue usado para clasificar el manantial termal de Alicún de las Torres como mesotermal en función de la temperatura medida que fue de 35°C¹⁰⁵.

Esta clasificación también fue utilizada por Moreno y col. para clasificar como mesotermal las aguas de la fuente termal de Tirandá en el estado Trujillo

Venezuela, donde registraron una temperatura de 39°C en las aguas de este manantial⁶⁷.

Si comparamos los valores de temperatura registrados para los manantiales mencionados anteriormente con la temperatura medida en este trabajo, se puede observar que las temperaturas son cercanas a la del manantial termal de Santa Apolonia y cumplen con el criterio de aguas mesotermiales.

En relación a las aguas del manantial La Mitisús se observa que estas son termiales de acuerdo a lo reportado en la tabla 5, ya que la temperatura promedio del afluente es 10,5°C superior a la temperatura promedio ambiental. Debido a que el manantial termal de La Mitisús presenta una temperatura promedio entre los 20°C y 30°C estas pueden clasificarse también como aguas hipotermiales²¹.

Esta clasificación fue utilizada para catalogar como hipotermiales manantiales ubicados en España. Entre estos encontramos los manantiales termiales de los baños de Alange y Concepción Villatoya que tienen temperaturas de 28°C cada uno^{106,107} y Jaraba cuya temperatura medida en el afluente es de 27°C⁴⁸.

Al comparar las temperaturas de estos manantiales con la temperatura del manantial termal de La Mitisús, es evidente que las temperaturas de emergencia son cercanas a las medidas en este trabajo para el manantial La Mitisús y cumplen con el criterio de hipotermalidad.

La temperatura es el factor ambiental más importante que controla el crecimiento microbiano. Los microorganismos difieren mucho en su requerimiento de temperatura para su crecimiento, por lo que cada microorganismo tiene un intervalo propio de temperatura para su crecimiento y desarrollo⁶⁸.

La temperatura puede afectar de dos maneras diferentes el desarrollo de los mismos; una temperatura mínima donde no existe crecimiento debido a la inhibición de funciones vitales, al ir aumentando la temperatura las reacciones enzimáticas aumentan su velocidad, por lo cual el crecimiento aumenta hasta llegar a una temperatura óptima en la cual el crecimiento es el más rápido posible,

al sobrepasar esta temperatura pueden ocurrir desnaturalización de las enzimas por lo que el crecimiento y supervivencia del microorganismo se inhibe. Las temperaturas mínimas, óptimas y máximas de crecimiento se denominan temperaturas cardinales, las cuales para los microorganismos varían de acuerdo a los factores ambientales donde se desarrollen²⁹.

Para conocer el pH en el cual prosperan los microorganismos en los manantiales termales en estudio, se realizaron medidas de pH en las muestras recolectadas.

En función de estas medidas se pudo determinar que las aguas termales de Santa Apolonia tienen un pH ligeramente básico reflejado por los valores medidos alrededor de pH 7 (Tabla 4), muy cercano a los valores de pH que se encuentran reportados en los estudios realizados en España en las aguas mesotermas de los baños de Puente Viesgo el cual tiene un pH de 7,6¹⁰⁴ y Alicún de las Torres un valor de pH de 7,2¹⁰⁵. Pero al comparar el valor de pH promedio 7,7 encontrado para el manantial de Santa Apolonia con la medida de pH 10 obtenido en el manantial termal de Tirándá se observa que este es superior⁸⁷.

Las diferencias de los valores de pH en los manantiales puede deberse principalmente a composición química de cada manantial. Los manantiales mesotermas con pH alrededor de 7, Puente Viesgo, Alicún de la Torre y Santa Apolonia están constituidos primordialmente por iones sulfatos y sulfitos que generan ácido sulfhídrico en aguas subterráneas, lo que origina pH ácidos o ligeramente básicos como los reportados en estos manantiales^{21,104,105}. En el caso del manantial termal de Tirándá ubicado en el estado Trujillo, este se encuentra constituido fundamentalmente por bicarbonatos, que son susceptibles a la hidrólisis lo que genera productos que aumentan el pH de los manantiales⁸⁷.

Por otra parte las aguas termales de La Mitisús presentan un pH alcalino con valores de pH entre 8-9 (tabla 4), valores superiores a los reportados normalmente en estudios realizados en manantiales hipotermas, como los reportados para los afluentes termales de los baños de Alange que tiene un pH de 5,5¹⁰⁵, Concepción Villatoya pH 7,9¹⁰⁶ y Jaraba con un pH de 7,5⁴⁸.

Como se mencionó anteriormente el pH está estrechamente relacionado con la composición química de cada manantial, se podría establecer la misma relación propuesta para el manantial termal de Santa Apolonia. Pero no se tiene reportes de la composición del manantial termal de La Mitisús. Por lo que no se puede establecer un patrón de comparación, relacionando los resultados obtenidos en este trabajo con los análisis realizados en manantiales que tienen la misma clasificación termal.

Al igual que la temperatura el pH afecta enormemente el crecimiento microbiano, a tal punto que cada especie posee un intervalo muy bien definido de pH donde se pueden desarrollar. La mayoría de las bacterias crecen entre pH 5,5 y 8^{29,68}, por lo que en las aguas de los manantiales termales de Santa Apolonia y La Mitisús pueden encontrarse una amplia variedad de microorganismos, sin ser en este caso el pH de las aguas termales de Santa Apolonia y La Mitisús un factor que inhiba el desarrollo de los mismos en estos manantiales¹⁰⁸.

5.2. Análisis microbiológico de las aguas termales La Mitisús y Santa Apolonia, estado Mérida.

5.2.1. Aislamiento e identificación de bacterias heterótrofas viables aerobias mesófilas.

En el estudio microbiológico de las muestras obtenidas de las dos fuentes termales se logró aislar 21 cepas bacterianas.

Al analizar la tabla 7 se observa que la mayor parte de las cepas aisladas en ambos manantiales fueron bacterias Gram negativas y muy pocas bacterias Gram positivas.

Se encontró que para el manantial termal de Santa Apolonia el número total de bacterias Gram negativas halladas fueron ocho lo que conforma el 88,88% de las cepas aisladas y una bacteria Gram positivas que representa el 11,11% del estudio realizado.

Por su parte en el manantial termal La Mitisús el número total de bacterias Gram negativas halladas fue 10 (83,33%) de las cepas aisladas y solo dos bacterias Gram positivas que representan el 16,66% del análisis.

En estudios realizados en España en los manantiales hipotermales de Concepción Villatoya, se encontró que la población microbiana está compuesta por 60% de bacterias Gram negativas y 40% por bacterias Gram positivas, lo que demuestra que la microbiota autóctona en este manantial está constituida principalmente por bacilos Gram negativos¹⁰⁷.

En análisis realizados en distintas aguas de los manantiales mineromedicinales de la región de Jaraba, España, se encontró un bajo número de microorganismos totales y viables, de los cuales la mayor proporción el 65% estuvo representada por bacterias Gram negativas y solo un 35% estuvo constituido por bacterias Gram positivas⁴⁸.

Por su parte en análisis realizados en manantiales mesotermales de Puente Viesgo, España, se aislaron cepas de bacterias heterótrofas que corresponden en su mayoría (62,5%) a los tipos morfológicos de bacilos Gram negativos y en una menor proporción (37,5%) se encontraron bacilos y cocos Gram positivos¹⁰⁴.

De igual forma en el manantial Alicún de las Torres el 54,5% de los aislados fueron bacterias Gram negativas y 45,5% lo representan las bacterias Gram positivas¹⁰⁵.

Como se puede observar los resultados obtenidos en este trabajo son similares a los descritos para manantiales clasificados como hipotermal y mesotermal.

Por el contrario en aguas de manantiales hipertermales se encuentra una proporción inversa a las descritas anteriormente, como se observa en los resultados obtenidos en las aguas de los manantiales de Alhama¹⁰⁹, donde encontraron que la mayor proporción (79,3%) de microorganismos estuvo constituida principalmente por bacterias Gram positivas y una menor (20,7%) proporción por bacterias Gram negativas. La misma tendencia se observó en el

estudio realizado en el manantial hipertermal Mar, ubicado en la isla La Toja¹¹⁰, España, observándose un 84,5% de bacterias Gram positivas y un 15,5% de bacterias Gram negativas.

Como se pudo observar diversos autores han encontrado que en manantiales hipotermales y mesotermales la población microbiana predominante se encuentra constituida por bacterias Gram negativas y poca proporción de bacterias Gram positivas. Lo que concuerda con lo aseverado por Mosso y col. en 1994; donde observaron el mismo comportamiento al estudiar 26 manantiales termales; concluyendo que para aguas hipotermales y mesotermales la microbiota predominante en estos ambientes son bacterias Gram negativas y cocos Gram positivos. Mientras que en manantiales hipertermales la mayor proporción de microorganismo está representada por bacterias Gram positivas. Esta diferencia se puede atribuir a la mayor estabilidad de las Bacterias Gram positivas a la temperatura¹¹¹

Se lograron aislar 21 cepas de ambos manantiales, 18 se identificaron a nivel de género en función de las pruebas comerciales API® 20 NE. Los tres aislados restantes solo se identificaron a nivel de género de acuerdo con las pruebas bioquímicas realizadas.

Se encontró que en manantial termal de Santa Apolonia la presencia de los géneros *Burkholderia*, *Pseudomonas* y *Staphylococcus*, y en el manantial de La Mitisús los géneros *Comamonas*, *Ralstonia*, *Pseudomonas*, *Shewanella* y *Staphylococcus*.

Para el agua del manantial termal de Santa Apolonia la mayor población (55,55%) de los microorganismos aislados perteneció al género *Burkholderia*, estos resultados son semejantes a los obtenidos en trabajos realizados en diferentes muestras ambientales.

Zanetti y col. en 2000, estudiaron muestras de agua potable en diferentes edificaciones de carácter público y privado de la provincia de Bologna, Italia, con el objeto de evaluar la aparición de especies del género *Burkholderia* y

correlacionarlo con diferentes parámetros fisicoquímicos (pH, temperatura, demanda química de oxígeno y dureza del agua), logrando encontrarlas en porcentajes relativamente altos en las muestras analizadas. Las especies aisladas pueden desarrollarse en ambientes que poseen cantidades limitadas de materia orgánica disueltas en el agua, por lo que posiblemente se alimenten de la materia orgánica proveniente de las biopelículas adheridas al interior de los reservorios de agua ¹¹².

En el 2009 de la Rosa y col. realizaron estudios microbiológicos en las aguas del manantial de Carratraca, donde determinaron el predominio de bacterias Gram negativas no fermentativas en estas aguas, además observaron que las especies de los microorganismos aisladas pertenecen principalmente al género *Burkholderia*. Los autores señalan, que debido a que estos microorganismos necesitan bajos recursos nutricionales, pueden adaptarse y proliferar fácilmente en manantiales mineromedicinales ¹¹³.

En el 2011, Limmathurotsakul y col. analizaron muestras de suelo de sembradíos de arroz en Tailandia, donde se aislaron especies del género *Burkholderia*. Los autores señalan que el hábitat natural de estos microorganismos son el suelo y la superficie de ambientes acuáticos. En específico la especie aislada fue la *Burkholderia pseudomallei*, que puede causar la melioidosis, la cual es la tercera enfermedad infecciosa más letal después del VIH/SIDA y la tuberculosis ¹¹⁴.

Tal como se puede observar las especies de este género están ampliamente distribuidas en la naturaleza, debido a que presenta bajos requerimientos nutricionales y fácil adaptabilidad a diferentes ambientes, por lo que no sorprende encontrar especies de este género en hábitats tan diversos como suelo, plantas, animales, rizoferas y agua ¹¹⁵.

Las bacterias pertenecientes al género *Burkholderia* son saprófitos con gran capacidad de degradar contaminantes orgánicos, por lo que intervienen en el reciclaje de materia orgánica, contribuyendo a la depuración de los ambientes donde se encuentran ¹¹⁶. Adicionalmente estas pueden ser patógenas para el

hombre y los animales; por ejemplo *Burkholderia pseudomallei* y *Burkholderia mallei* son capaces de ocasionar enfermedades de alta mortalidad³³.

En las aguas de los manantiales termales estudiados se encontró la presencia del género *Pseudomonas*, representando el 33,3% de los aislados de las muestras analizadas en la localidad de Santa Apolonia y un 8,33% en las cepas obtenidas en las muestras del manantial La Mitisús.

Un estudio realizado por Mosso y col. en 1981 para analizar la micropoblación y determinar la calidad sanitaria de los manantiales termales de la región de Carabaña, se encontraron diferentes microorganismos mohos, levaduras y bacterias de interés sanitario entre los que se aisló principalmente especies del género *Pseudomonas*, lo que indica una posible contaminación de estos manantiales, sin embargo en este casos se debe realizar un mayor número de estudios, para establecer con certeza si existe dicha contaminación, debido a que las bacterias del género *Pseudomonas* también intervienen en los ciclo de la naturaleza, por lo que tienen importancia ecología y pueden encontrarse frecuentemente en ambientes acuáticos como los manantiales termales¹¹⁷.

En un estudio realizado por Mosso y col. en 1990 para determinar la calidad sanitaria y conocer la microbiota presente en el manantial termal de la región de Alange, España, se encontró que unos de los principales géneros hallados fue *Pseudomonas* junto con *Halomonas* y *Aeromonas*. Dicho estudio señala que las bacterias de estos géneros pueden encontrarse en el suelo y que a través de esté o por el polvo pueden llegar a los ambientes acuáticos¹⁰⁶.

Por otra parte, Hossain y col. en 2009 realizaron aislamiento de microorganismo presentes en muestras de sedimentos de las aguas termales de Sitakunda, en Bangladesh, identificando diversos microorganismos, entre los cuales se encontró una especie del género *Pseudomonas*, en específico *Pseudomonas mendocina*¹¹⁸.

Los resultados obtenidos en este trabajo, son similares a los reportados en los trabajos mencionados anteriormente, ya que en este trabajo también se logró aislar bacterias del género *Pseudomonas* en los manantiales termales de Santa

Apolonia y La Mitisús, los cuales poseen las condiciones de temperatura y pH que permiten el desarrollo de estos microorganismos, sumado a los bajos requerimientos nutricionales de las bacterias de este género.

Las especies de *Pseudomonas* son ubicuas, lo cual puede ser consecuencia de los bajos requerimientos nutritivos que posee, puede vivir en numerosos hábitats, que van desde diversos tipos de ambientes acuáticos y terrestres, hasta tejidos de animales y plantas, incluyendo frutas y verduras, por lo que su hábitat primario es ambiental, que contenga compuestos orgánicos simples o complejos, así pues las especies de *Pseudomonas* se encuentran en suelos y aguas que presentan condiciones aeróbicas, mesófilas y pH neutro³².

Es importante mencionar que la *Pseudomonas* presentan una versatilidad metabólica muy grande que se traduce en su capacidad de utilizar como fuente de carbono sustratos muy variados (hay especies, que pueden utilizar como nutrientes más de 100 compuestos químicos diferentes). Por lo que participan frecuentemente en los procesos naturales de auto depuración del agua; y son candidatas para el tratamiento de desechos ambientales, como metales pesados y gran variedad de compuestos xenobioticos^{107,38}.

La *Pseudomonas* poseen varios factores de virulencia entre los que se incluyen componentes estructurales, toxinas y enzimas. Siendo difícil establecer el papel de cada factor en la patogenia de la enfermedad, por lo que se cree que la virulencia de *Pseudomonas* es multifactorial. Las especies del género *Pseudomonas* son patógeno oportunista que puede causar infecciones muy serias con alta tasa de mortalidad en pacientes comprometidos, especialmente han aumentado los datos de infecciones producidas en los pulmones de pacientes con fibrosis quística³³.

Otro de los géneros encontrados en mayor proporción en las muestras de agua analizadas en el manantial termal La Mitisús, fue *Comamonas* representando el 58,3% de los aislados en esta localidad.

Manaia y col. en 1990 analizaron diferentes marcas de agua minerales no carbonatadas de Portugal, Francia y Bélgica, aislando más de 317 cepas, en su

mayoría del género *Comamonas*, encontrando variaciones considerables en las poblaciones de microorganismos entre las marcas, lo que podría ser consecuencia de las bacterias presentes en las fuentes de las aguas minerales, así como por contaminación durante el proceso de embotellado¹¹⁹.

Chou y col. en 2007 aislaron una cepa del género *Comamonas* del intestino de la termita *Odontermes formosanus*, recolectadas de plantas de bamboo al sureste de Taiwan. La cepa resultó ser Gram negativa, no fermentativa, no pigmentada y no esporulada, relacionada mediante análisis filogenético y comparación de ácidos grasos con las especies *Comamonas testosteroni* y *Comamonas koreensis*, nombrada *Comamonas odontotermitis*¹²⁰.

Igualmente, Kim y col. en 2008, aislaron una cepa proveniente de los gránulos bacterianos en el bioreactor de una planta de tratamiento de aguas residuales en la ciudad de Kongju, Republica de Corea. La cepa fue positiva para catalasa y oxidasa, pero negativa para gelatinasa y β -galactosidasa, determinándose por análisis filogenético y de comparación de ácidos grasos que era una nueva especie del género *Comamonas*, nombrada como *Comamonas granullii*¹²¹,

Los estudios anteriormente mencionados concuerdan con los datos obtenidos en este trabajo, lo que demuestra que las especies del género *Comamonas* pueden encontrar en una gran variedad de ambientes, gracias a su versatilidad metabólica.

Las especies pertenecientes a este género pueden crecer en ácidos orgánicos, amino ácido y peptonas, pero raramente degradan carbohidratos. Algunas especies pueden mineralizar complejos y compuestos xenobióticos, tales como la testosterona y 4-cloronitrobenzeno. Sus múltiples nichos hacen del género *Comamonas* ambientalmente importante, lo que sugiere que se pueden adaptar muy bien a diferentes ambientes desde el punto de vista ecológico y fisiológico⁵⁰.

Los miembros del género *Comamonas* se encuentran frecuentemente en diversos hábitats, incluyendo lodos activos, pantanos, ambientes acuáticos, en tejidos de plantas y animales. Estos microorganismos también se han aislado de

equipamientos hospitalarios y muestras clínicas humanas, gracias a su baja patogenicidad pocas veces tienen importancia clínica³³, aunque se ha reportado algunos casos de comportamientos agresivos debido a que son patógenos oportunistas⁴⁹.

En las muestras de agua analizadas en el manantial termal de La Mitisús se encontró la presencia del género *Ralstonia*, constituyendo el 8,33% de las cepas aisladas de este manantial.

Lee y col. en el 2001, lograron aislar una bacteria termotolerante, del manantial termal de la ciudad de Pohang, en Corea, con la habilidad de crecer en benceno, tolueno, etilbenceno y xileno. Dicha cepa resultó ser un bacilo Gram negativo, aerobica, que crece a una temperatura óptima de 42°C. De acuerdo con los estudios fenotípicos y filogenéticos, esta cepa está estrechamente emparentada con la especie *Ralstonia eutropha*¹²².

Gómez y col. en 2005, analizaron muestras de suelo y tejido vegetal de plátanos en seis regiones productoras de Colombia, obteniendo 189 cepas bacterianas de las cuales, 98 cepas provenientes del suelo y 8 cepas de tejidos se identificaron como *Ralstonia solanacearum*. A dichas cepas se les realizó pruebas controladas de patogenicidad bajo condiciones de invernadero, observándose que 35 de ellas fueron altamente patógenas, 28 moderadamente patógenas, 8 tuvieron patogenicidad baja y solo una no resultó ser patógena¹²³.

En 2006, Reith y col. aislaron diferentes microorganismos de los suelos y rocas cercanas a yacimientos de oro en dos localidades de Australia, más de 30 especies que no deberían encontrarse en el suelo, entre las que se encuentra bacterias del género *Ralstonia*, específicamente *Ralstonia metallidurans*, la cual posee la habilidad de precipitar algunos metales pesados en solución acuosa en condiciones de laboratorio. Entre los metales que puede precipitar esta especie está el oro¹²⁴.

Como se puede observar existen investigaciones donde se han aislado bacterias del género *Ralstonia*, en diversos hábitats, lo que concuerda con lo observado en

los manantiales termales analizados. Esto demuestra la gran versatilidad de este género para colonizar dicho ambientes.

Desde el punto de vista ecológico las especies del género *Ralstonia* ocupan variados nichos, pueden afectar principalmente a plantas y vegetales, generando importantes pérdidas económicas debido a la afectación de cultivos como la papa, tomate y plátano. Estos microorganismos ambientales son considerados de gran importancia, debido a su posible uso como agentes para la bioremediación de suelos y aguas contaminadas con metales pesados y compuestos organoclorados¹²⁵.

Las especies de este género pocas veces se asocian con infecciones humanas, sin embargo se han reportado como causantes de infecciones hospitalarias por el uso de soluciones salinas estériles y otro tipo de equipamiento médico en pacientes inmuno-comprometidos³³. Por otra parte, es bien conocido que ellas presentan alta patogenicidad para plantas, marchitándolas por la producción de pectinasas, celulasas, ácido indolacético y etileno⁶⁸.

En el agua del manantial termal de La Mitisús también se encontró la presencia del género *Shewanella* el cual representó el 8,33 % de las cepas aisladas.

Toffin y col. en 2005 lograron aislar del sedimento de aguas en el canal de Nankai en las costas de Japón, una cepa bacteriana piezotolerante, mesofila anaeróbica facultativa, flagelada polar y organotrófica, capaz de utilizar una amplia variedad de compuestos como fuente de carbono y energía. Se observó que la presión óptima de crecimiento fue de 10 MPa. Los estudios filogenéticos demuestran que esta cepa esta relacionada en un 98% con *Shewanella putrefaciens*, pero debido a las pruebas de ácidos grasos y las características fenotípicas se concluyó que la misma es una nueva especie, denominada *Shewanella profunda*¹²⁶.

Miyazaki y col. en 2006 asilaron seis cepas del género *Shewanella*, provenientes de sedimento de aguas profundas del mar de Japon, a una profundidad entre 2406-2409 m. las pruebas filogenéticas y de comparación de ácidos grasos

lograron determinar la existencia de tres nuevas especies del género *Shewanella* nombradas *Shewanella kaireitica*, *Shewanella abyss* y *Shewanella surugensis*¹²⁷.

En 2006, Gao y col. asilaron una cepa proveniente de los respiraderos hidrotermales de la isla Loihi en el océano Pacífico, el cual resultó ser de color naranja, Gram negativo, flagelado polar, anaeróbico facultativo y psicrotolerante (0-42°C). Basándose en las pruebas filogenéticas y las características fenotípicas, se determinó que la cepa fue una nueva especie del género *Shewanella*, la cual se nombró como *Shewanella loihica*¹²⁸.

Como se puede observar las especies del género *Shewanella* se encuentran frecuentemente en ambientes acuáticos, principalmente marinos y aguas dulces, lo que concuerda con lo encontrado en el manantial termal de La Mitisús, posiblemente la gran adaptabilidad que posee el género *Shewanella*; le permite a sus especies soportar ambientes extremos de temperatura y presión¹²⁶.

El género *Shewanella* incluye especies psicrófilas y mesófilas, distribuidas ampliamente en la naturaleza, especialmente en ambientes acuáticos de agua dulce y salada; debido posiblemente a su potencial para formar asociaciones microbianas con microorganismos fermentativos o que puedan usar los subproductos de la *Shewanella*. La mayoría de las especies de *Shewanella* son no fermentadoras pero suelen colonizar con microorganismos fermentadores, utilizando los productos finales de la fermentación (lactato, formiato, hidrógeno, y algunos amino ácidos) para realizar la respiración anaeróbica. Los subproductos de la respiración anaeróbica tales como el acetato, amoníaco y alanina pueden ser usados por acetógenos, metanógenos, organotrofos y litotrofos, dependiendo del ambiente⁵⁵.

Las especies del género *Shewanella*, no son comúnmente halladas en muestras clínicas. Sin embargo, existen numerosos reportes que asocian a las especies de este género, especialmente la *Shewanella algae*, como la causante de un gran número de afecciones, entre la que podemos encontrar; úlceras cutáneas, peritonitis, endocarditis infecciosa e infecciones óticas y oculares^{33,56}.

Las bacterias Gram positivas aisladas, específicamente cocos Gram positivos se encontraron en baja proporción y corresponden al género *Staphylococcus*. Estos representan el 11,11 % de los aislados en el manantial de Santa Apolonia y un 16,66% de las cepas aisladas en el manantial de La Mitisús.

Estas bacterias se consideraron *Staphylococcus* coagulasa negativa debido a su comportamiento en las pruebas bioquímicas respectivas, donde se observó que las tres cepas aisladas no responden a la formación coágulos, son catalasa positiva y aunque crecen en Agar manitol salado no producen cambio de color en el medio, por lo que se descartó que las especies encontradas pertenecieran a la especie *Staphylococcus aureus*.

Mosso y col. en 1982 estudiaron las aguas mineromedicinales del balneario de Fuente Amarga, España, con el objeto de determinar los microorganismos patógenos e indicadores de contaminación fecal, y los microorganismos autóctonos propios de este tipo de aguas. Aislando un bajo número de bacterias del género *Staphylococcus*, género frecuentemente aislado en manantiales termales¹²⁹.

Vendrell y col. en 1998 realizó estudios microbiológicos en 10 muestras recogidas de dos puntos situados en la fuente termal del Tinteiro, España y cuatro puntos en las inmediaciones de la misma, con el objeto de comprobar su posible contaminación bacteriológica, debido a que estas son usadas como aguas de consumo. En este trabajo se determinó la presencia de diversos patógenos para humanos, entre estos *Staphylococcus* cuya presencia en aguas de consumo está prohibida por la Legislación Española¹³⁰.

En 2002, Mosso y col. estudiaron los microorganismos de interés sanitario, que puedan ser un riesgo para la salud de los usuarios, además de la microbiota autóctona presentes en el balneario de Alhama en España, identificando 53 cepas bacterianas, entre las cuales se encontró el género *Staphylococcus* en proporciones relativamente bajas. Este género se encuentra ampliamente

diseminado en diferentes ambientes, por lo que puede llegar a los manantiales termales gracias a la lluvia, el suelo o el aire¹⁰⁹.

De la Rosa en el 2009, realizaron determinaciones de los microorganismos de interés sanitario y también de la microbiota autóctona de los manantiales del balneario de Alicún de las Torres, en Granada, España, donde aislaron 60 cepas, de las cuales una baja proporción pertenece al género *Staphylococcus*, debido a que estas bacterias son frecuentes en este tipo de manantiales termales, por capacidad de desarrollarse en ambientes con altas concentraciones minerales¹⁰⁵.

Como se puede observar diferentes estudios llevado a cabo en España, coinciden con los resultados obtenidos de los análisis realizados en los manantiales termales de Santa Apolonia y La Mitisús, donde también se encontró una baja proporción de microorganismos del género *Staphylococcus*.

El hábitat natural de *Staphylococcus* es la piel de los mamíferos, sin embargo se pueden encontrar en otras partes del cuerpo como la garganta, la boca, las glándulas mamarias y el tracto intestinal. Las especies de este género se encuentran diseminadas en la naturaleza y pueden hallarse en diversos ambientes, tales como suelo, arena de playa y en aguas, así como en alimentos y productos animales como lo son leche, huevos, queso y carne^{33,61}.

Staphylococcus son los microorganismos que se aíslan con mayor frecuencia en muestras clínicas, estas bacterias pueden causar infecciones por multiplicación tanto local como sistémica. Las especies del género *Staphylococcus* son las causantes infecciones como la osteomielitis, neumonía y endocarditis aguda, además de producir shock tóxico, intoxicación alimentaria y síndrome de piel escaldada¹³¹.

De las 21 cepas asiladas, solamente 18 cepas fueron identificadas a nivel de género y especie en ambos manantiales termales, estas son en su totalidad bacterias Gram negativas no fermentadoras (BGNNF), que en su mayoría asimilan los hidratos de carbono (glucosa) de forma oxidativa, son móviles y la mayor parte

de los aislados tienen la capacidad de reducir nitratos a nitritos (Tabla 8, 9, 10 y 11).

Para el manantial termal de Santa Apolonia las especies encontradas fueron *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas aeruginosa*. Con respecto al manantial termal de La Mitisús las especies halladas fueron *Comamonas testosteroni*, *Ralstonia pickettii*, *Pseudomonas stutzeri* y *Shewanella putrefaciens*.

Para el manantial termal de Santa Apolonia la mayor proporción de BGNNF aislada estuvo constituida principalmente por la especie *Burkholderia cepacia* que representó el 62,5% de las cepas encontradas.

Diversos autores han realizados estudios en manantiales termales ubicados en España, con el principal objetivo de estudiar la calidad sanitaria, así como la microbiota autóctona de los balnearios mineromedicinales, ya que estos son usados principalmente por personas con fines terapéuticos, reportando la presencia predominante de *Burkholderia cepacia*, estos resultados son similares a los encontrados en este trabajo para el manantial termal de Santa Apolonia.

De la Rosa y col. en 2004 aislaron 254 cepas de bacterias heterótrofas de cinco manantiales bicarbonatados termales situados en la localidad de Jaraba, España, las muestras fueron tomadas en tres épocas del año. Logrando identificar 244 cepas, En todos los manantiales han predominado los bacilos Gram negativos, observándose un gran número de bacterias pertenecientes a la especie *Burkholderia cepacia*. Esta especie está estrechamente relacionada con el género *Pseudomonas* por lo que presentan gran versatilidad enzimática que le permite desarrollarse en diferentes ambientes acuáticos entre ellos los manantiales termales⁴⁸.

En el mismo contexto Mosso y col. en 2006 estudiaron dos manantiales mineromedicinales de aguas bicarbonatadas Cervantes y San Camilo, utilizados en tratamientos terapéuticos en el Balneario Cervantes, España. Se aislaron 75 cepas de bacterias heterótrofas de las cuales se identificaron 71 que

correspondieron en su mayoría a bacilos Gram negativos, encontrándose especies fermentadoras y no fermentadoras, lo que es característico de aguas mineromedicinales. Las cepas de bacterias heterótrofas aisladas correspondieron predominantemente a la especie *Burkholderia cepacia*. Este microorganismo es frecuente en aguas minerales ya que es muy ubicuo y necesita muy pocos nutrientes para su desarrollo¹³².

Más recientemente Mosso y col. en el 2011 realizaron estudios microbiológicos en tres manantiales termales del balneario de los baños de Concepción. Aislando, 135 cepas de bacterias heterótrofas y oligotrofas, que correspondieron en mayor proporción a bacilos Gram negativos del género *Pseudomonas*, junto con otras especies del género *Burkholderia*, específicamente la especie *Burkholderia cepacia* muy próximos desde el punto de vista taxonómico¹⁰⁷.

Burkholderia cepacia presenta un amplio espectro nutricional y no requiere de factores de crecimiento para su desarrollo. Se ha encontrado como una especie dominante en las comunidades microbianas del suelo y del agua, expresando su extraordinaria versatilidad metabólica, degradando compuestos aromáticos clorados para utilizarlo como fuente de carbono y energía. Debido a esto *Burkholderia cepacia* es un microorganismo ubicuo, por lo que se puede encontrar en manantiales termales^{33,41,46}.

En el ámbito clínico *Burkholderia cepacia* constituye una importante causa de infección nosocomial. En la actualidad este microorganismo se reconoce como el causante de infección en pacientes inmunocomprometidos o críticamente enfermos; en estos pacientes puede ocasionar neumonía, infecciones de vías urinarias, endocarditis y bacteriemia. Esta última se produce en forma de brotes o casos aislados, al ser inoculada la bacteria de una fuente externa por un procedimiento invasivo^{33,133}.

En los dos manantiales termales estudiados se encontró la presencia de tres especies del género *Pseudomonas*. Las especies halladas de este género en el manantial de Santa Apolonia pertenecen al grupo fluorescente, *Pseudomonas*

fluorescens (25%) y *Pseudomonas aeruginosa* (12,5%). Por su parte en el manantial de La Mitisús, la especie aislada fue *Pseudomonas stutzeri* (10%).

Bischofberger y col. en 1990, realizaron un estudio comparativo de la microbiota de las aguas de un manantial mineral antes y después del envasado, en la región central de Suiza. Ellos lograron determinar que la especie predominante en el manantial era *Pseudomonas fluorescens*, observando variaciones de la población microbiana después del envasado y del tipo de material del envase. Después de una semana de almacenado en los envase de vidrio se observó un crecimiento lento de *Pseudomonas* no fluorescentes, por el contrario, en las botellas de plástico sucedió un crecimiento rápido de *Pseudomonas fluorescens*. Esto debido a la inhibición del crecimiento bacteriano en las botellas de vidrio a la presencia de residuos de detergentes¹³⁴.

En 1998, Jayasekara y col. estudiaron la población microbiana de 16 marcas de aguas minerales embotelladas no carbonatadas en Australia, con el objeto de determinar la población de *Pseudomonas*, ya que en reportes anteriores demostraron que el género de mayor presencia en este tipo de aguas era *Pseudomonas*. Ellos lograron determinar la presencia de varias especies de *Pseudomonas* en 11 de las marcas siendo una de las de mayor frecuencia la especie *Pseudomonas fluorescens*¹³⁵.

Guyard y col. en 1999, aislaron 15 cepas bacterianas de manantiales de agua minerales en Francia, todas las cepas fueron no fermentadoras, oxidasa positivas y Gram negativas, y la gran mayoría generaron pigmentos amarillos y naranjas. Dos de las cepas fueron identificadas como *Pseudomonas fluorescens*. Lo que concuerda con el hecho de que las especies del género *Pseudomonas* son muy comunes en aguas minerales francesas¹³⁶.

Finalmente De la Rosa y col. en 2013, estudiaron la microbiota alóctona y autóctona del balneario termal de Raposo, España, logrando aislar 115 cepas de bacterias heterótrofas viables y oligotrofas, en su mayoría bacilos Gram negativos, con pigmentos carotenoides (amarillos y naranjas) y fluorescentes, del género

Pseudomonas, entre las cuales se encontró en mayor proporción *Pseudomonas fluorescens*. Esta bacteria presenta bajos requerimientos nutricionales y gran diversidad metabólica, permitiéndole desarrollarse en ambientes oligotróficos como lo son las aguas mineromedicinales¹³⁷.

Como se puede observar la especie *Pseudomonas fluorescens*, es frecuentemente aislada en ambientes acuáticos, tanto termales como no termales, lo que es similar a los resultados obtenidos en el análisis de las aguas del manantial de Santa Apolonia.

Pseudomonas fluorescens es un saprófito del agua y el suelo, también se pueden encontrar frecuentemente en la raíz de las plantas. Este microorganismo tiene un metabolismo muy versátil, por lo que desempeña un papel fundamental en los ciclos biogeoquímicos del carbono y del nitrógeno, así como en el mantenimiento del equilibrio biológico en los ecosistemas donde habitan, contribuyendo a la depuración de contaminantes orgánicos.^{41,138}.

Esta especie es generalmente considerada de baja virulencia y de poca importancia clínica, a pesar de esto ha sido identificada como contaminante de la piel de los humanos y como agente causante de pseudobacteremia e infecciones causadas en pacientes inmunocomprometidos, especialmente relacionados con transfusiones de sangre¹³⁹, bacteremia por cateterismo y peritonitis en pacientes de diálisis¹⁴⁰.

Como se mencionó anteriormente otra de las especies aisladas en el manantial de las aguas termales de Santa Apolonia fue la *Pseudomonas aeruginosa*.

Mosso y col. en 1986, analizaron aguas mineromedicinales del balneario de Archena, España, con el objeto de determinar la flora microbiana desde el punto de vista sanitario y ecológico, logrando aislar especies del género *Pseudomonas*, entre las que se encontró la *Pseudomonas aeruginosa*. Esta especie se logró aislar en los dos puntos de recolección para el primer muestreo y solamente en uno para el segundo, por que los autores deducen que la presencia de este microorganismo es accidental¹⁴¹.

Rivas en el 2011, estudió las bacterias Gram negativas procedentes de sedimentos de aguas termales del manantial Moises, en Cariaco, Venezuela, aislando 70 cepas de las cuales la especie *Pseudomonas aeruginosa* se encontró solamente en dos de los cuatro pozos evaluados, observando que dichas bacterias son hidrofóbicas lo que le confiere la propiedad de adherirse a las superficies y de esta manera formar biopelículas, lo que permite la colonización en diversos ambientes¹⁴².

En 2012, Rondón y col. estudiaron la microbiota bacteriana heterótrofa cultivable de las aguas del sector Aguas Calientes de Tabay, Venezuela, logrado aislar 24 cepas bacterianas, de dos manantiales de dicho sector, de las cuales nueve fueron bacterias Gram negativas no fermentadoras, entre las cuales se encontró *Pseudomonas aeruginosa*, en la muestra tomada en la piscina del balneario del complejo Santa María¹⁴³.

Como se puede observar *Pseudomonas aeruginosa*, se ha aislado en ambientes hidrotermales en bajas proporciones respecto a otras especies del género *Pseudomonas* que conviven en los mismos ambientes, esto concuerda con lo encontrado para el manantial termal de Santa Apolonia. Sin embargo, es importante notar que *Pseudomonas aeruginosa* no forma parte de la flora habitual de aguas minerales naturales, en tanto que la *Pseudomonas fluorescens* se encuentra típicamente en suelos y ambientes superficiales³⁸.

La especie *Pseudomonas aeruginosa* presenta una versatilidad metabólica que se traduce en su capacidad de utilizar como fuente de carbono substratos muy variados (puede usar más de 80 compuestos orgánicos), permitiéndole colonizar diferentes ambientes donde son escasos los nutrientes, como lo son los ambientes hospitalarios³⁸.

Esta especie es el pseudomonadal es la que se aísla con mayor frecuencia en muestra clínicas, las infecciones por *Pseudomonas aeruginosa* prevalecen especialmente en pacientes con quemaduras, fibrosis quística, leucemia aguda, trasplante de órganos y adicción a drogas intravenosas, Las infecciones suelen a

ocurrir en cualquier sitio donde se tiende a acumular la humedad. Adicionalmente pueden causar infecciones en las vías urinarias y en las vías respiratorias altas; estas últimas puede ser graves incluso potencialmente mortales en huéspedes inmunocomprometidos³³.

Debido al gran número de afecciones causadas por *Pseudomonas aeruginosa*, este se considera la bacteria de mayor importancia clínica entre los bacilos Gram negativos no fermentadores.

Es importante destacar, aunque no es tema de este estudio, que la detección de *Pseudomonas aeruginosa* en las aguas del manantial termal de Santa Apolonia, donde este afluente es usado con fines recreacionales y medicinales, es necesario implementar acciones para su eliminación, debido a que de las dos especies de *Pseudomonas* aisladas en dicho manantial, ésta es la de mayor importancia clínica, sumado a esto se han documentados brotes de dermatitis y otitis externa por *Pseudomonas aeruginosa* asociadas con el uso de piscinas y balnearios en aguas termales^{33,144}.

Como se mencionó anteriormente, en las aguas termales del manantial de La Mitisús se encontró una sola especie del género *Pseudomonas*, el cual se identificó como *Pseudomonas stutzeri*.

Quevedo y col. en 1986, estudio la microflora aeróbica heterótrofa de nueve manantiales termales en la región de Lanjarón, España, observando que la flora bacteriana es muy similar entre en todos los manantiales. La mayoría de las cepas aisladas fueron bacterias Gram negativas del género *Pseudomonas* y miembros de otros géneros. De las especies del género *Pseudomonas*, se encontró en baja proporción la especie *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas maltophilia*; dichas especies no presentaron variaciones estacionales en su frecuencia de aparición, por lo que se concluyó que las especies de este género son autóctonas de estos manantiales¹⁴⁵.

En 1993, Guillot y col. reportaron el estudio de cuatro marcas de agua mineral francesas no carbonatadas, para determinar los organismos heterótrofos. La

población bacteriana total fue dividida en dos grupos; las pertenecientes a los *Pseudomonadales* y las cepas no identificadas, donde los resultados fenotípicos no revelaron diferencias significativas entre las marcas. De las especies del género *Pseudomonas*, fue *Pseudomonas fluorescens* la que se encontró en mayor proporción, mientras que la *Pseudomonas stutzeri* y *Pseudomonas vesicularis*, fueron las de menor frecuencia¹⁴⁶.

De igual manera, Mosso y col. en 1994, estudiaron la población bacteriana heterótrofa de 26 aguas minerales españolas, aislando 665 cepas de todos los manantiales, donde se observó una predominancia por parte de las especies del género *Pseudomonas* y otros géneros cercanos taxonómicamente, en todos los manantiales. Sin embargo *Pseudomonas stutzeri* solo se encontró en uno de los 26 manantiales estudiados¹¹¹

Los resultados encontrados para el manantial de La Mitisús, respecto a la frecuencia de *Pseudomonas stutzeri*, son similares a los encontrados por diferentes autores en aguas termales y minerales.

La flexibilidad metabólica, diversidad bioquímica y fisiológica de *Pseudomonas stutzeri*, le confiere la capacidad de crecer organotroficamente a través de la mineralización de un amplio rango de sustratos orgánicos. Ella puede crecer en condiciones anaeróbicas utilizando diversos aceptores de electrones, mediante un metabolismo estrictamente oxidativo, usando diferentes fuentes de nitrógeno, por lo que es parte importante de los ciclos naturales del carbono, nitrógeno, azufre y fósforo. Debido a su versatilidad metabólica puede colonizar diferentes nichos ecológicos; resistiendo condiciones extremas de temperatura y presión, por lo que se han aislado intencionalmente o accidentalmente en muchos hábitats incluyendo el suelo, ríosfera, aguas subterráneas, termales e incluso el cuerpo humano¹⁴⁷.

Pseudomonas stutzeri se ha encontrado en diferentes muestras clínicas, debido a que este microorganismo es un patógeno oportunista como la mayoría de las especies del género. Sin embargo no está clara la asociación de esta especie con los procesos infecciosos, aunque muchos autores la señalan como la causante de

diferentes afecciones como otitis media, conjuntivitis, neumonía, artritis séptica, endocarditis, meningitis en pacientes VIH positivos, infecciones de injertos vasculares sintéticos e infecciones de heridas traumáticas^{33,147}.

La especie con mayor presencia en el manantial termal de La Mitisús fue *Comamonas testosteroni* representando el 70% de las cepas aisladas.

De la Rosa y col. en 1991, realizaron estudios con el objetivo de determinar la calidad sanitaria y conocer la microbiota autóctona de dos manantiales mineromedicinales ubicados en el municipio de Fitero, España, aislando 98 cepas, 55 en el manantial Palafox y 43 en el manantial Bequer. Solamente en este último se logró aislar la especie *Comamonas testosteroni*, debido a que posiblemente se encuentra en un número muy bajo. Sin embargo, en determinadas condiciones de temperatura, flujo lento y puntos muertos estás pueden multiplicarse¹⁴⁸.

En 1992, Mavridou, estudio la microflora durante el proceso de extracción, embotellamiento y almacenamiento aguas minerales naturales del Reino Unido, encontrado un crecimiento de bacterias Gram negativas pigmentadas y no pigmentada, en todas las etapas del proceso, observándose la predominancia de las especie del género *Pseudomonas* y especies estrechamente relacionadas como *Comamonas testosteroni*¹⁴⁹.

En 2009, Pandey y col. lograron aislar una cepa de un manantial termal sulfuroso en la india, con capacidad de oxidar tiosulfato, esta cepa se relacionó mediante composición de ácidos grasos y análisis filogenico en un 99,9% con la especie *Comamonas testosteroni*, siendo el primer reporte de una especie de *Comamonas* que presenta actividad oxidativa para tiosulfato en condiciones mixotróficas¹⁵⁰.

Al comparar los resultados obtenidos por otros autores con los observados en este trabajo, se puede decir que es posible aislar la especie *Comamonas testosteroni* en aguas de manantiales termales y minerales. Sin embargo, se observó una diferencia significativa en el número de cepas aisladas de *Comamonas testosteroni* reportadas por los otros autores con las obtenidas en este estudio,

posiblemente a las condiciones multifactoriales que definen a cada ambiente, por lo que la microbiota es específica de cada localidad.

Comamonas testosteroni, posee una distribución geográfica amplia, es un saprófito del suelo y del agua, capaz de degradar diferentes compuestos aromáticos para utilizarlos como fuente de carbono y energía, en específico es capaz de degradar esteroides como la testosterona. Esta especie es de importancia ecológica gracias a su capacidad de degradar contaminantes orgánicos. Se ha aislado de animales, productos alimenticios, equipamientos hospitalarios y muestra clínicas^{50,47}.

Aunque *Comamonas testosteroni* se conoce como una especie normalmente ambiental y de baja patogenicidad, se sabe en reportes de su comportamiento agresivo como patógeno oportunista en individuos inmunocomprometidos⁴⁹. Este microorganismo se encuentra a menudo relacionado con anomalías anatómicas del aparato digestivo, la más frecuente es la perforación apendicular, infecciones relacionadas con catéter venoso central e infecciones respiratoria en pacientes con fibrosis quística³³.

En las muestras analizadas del manantial termal de La Mitisús se encontró la especie *Ralstonia pickettii*, representando solamente el 16,66% de las cepas aisladas.

Kulakov y col. en 2002. en Estados Unidos aislaron bacterias provenientes de muestras de agua ultra pura de una fábrica de semiconductores, las cuales pueden comprometer la calidad del producto final. Logrando aislar en su mayoría bacilos Gram negativos aeróbicos, y mediante el uso de pruebas filogenéticas se determinó que varias cepas aisladas corresponden a la especie *Ralstonia pickettii*. La presencia de este tipo de microorganismos se puede deber a la existencia de genes fijadores de nitrógeno presentes en estas bacterias, ya que en diversos procesos de purificación del agua se hace uso de este gas¹⁵¹.

En el 2008 Mosso y col. en dos manantiales termales de los balnearios de Valdelateja, España, lograron aislar 114 cepas en su mayoría bacterias Gram

negativas no fermentadoras, encontrando solamente en el manantial Termas, en baja proporción la presencia de la especie *Ralstonia pickettii*, esta es una bacteria ubicua, aislada frecuentemente en agua debido a sus escasos requerimientos nutricionales y ha sido encontrada en algunos manantiales mineromedicinales⁴¹.

Más recientemente, Ryan y col. en 2011, asilaron 59 cepas de diferentes muestras de agua ultra pura de sistemas de purificación en ambientes clínicos e industriales de Francia e Irlanda, todas las bacterias resultaron ser bacilos Gram negativos no fermentadores y oxidasa-catalasa positivos, los cuales mediante pruebas fenotípicas, bioquímicas, API® 20NE y filogenéticas se identificaron como *Ralstonia pickettii*, en mayor proporción¹⁵².

De acuerdo a lo antes expuesto y a los resultados obtenidos en este estudio, la especie *Ralstonia picketti*, se puede encontrar en diversos ambientes extremos, que incluyen desde muestras clínicas, aguas ultrapuras de laboratorios e industrias y manantiales termales.

Ralstonia pickettii posee una gran habilidad biodegradativa lo que la ayuda a vivir y adaptarse a ambientes con cantidades limitadas de nutrientes (ambientes oligotróficos), por lo que puede estar presente en diferentes nichos ecológicos, desarrollándose en ambientes como ríos, suelos, lodos activos, muestras clínicas y diferentes ambientes acuáticos^{153,154}.

Gracias a las singulares propiedades de biodegradación que posee *Ralstonia pickettii*, esta especie es una potencial candidata a usarse en aplicaciones comerciales, como la bioremediación¹⁵².

La especie *Ralstonia pickettii* ha sido pocas veces asociada con infecciones humanas, pero en la última década ha sido reconocido como un patógeno nosocomial que causa bacteremia, meningitis e infecciones urinarias en pacientes inmunosuprimidos. Estos brotes han sido asociados principalmente con el uso de equipamiento médico y soluciones estériles^{33,155}.

Por último en el manantial termal de La Mitisús se encontró la especie *Shewanella putrefaciens*, lo que representa el 10% de las cepas aisladas en este manantial.

Nealson y col. en 1988, aislaron 13 cepas de muestras provenientes de diferentes profundidades de las aguas del mar Negro, observaron que a las profundidades de 55 y 85 m la especie *Shewanella putrefaciens* era predominante, debido posiblemente a la variabilidad de la composición química respecto a la profundidad¹⁵⁶.

Jacovides y col. en 2007, realizaron un estudio de dos manantiales de aguas minerales del Parque Nacional Valle de la Muerte en Nevada, USA, logrando aislar 23 cepas bacterianas sulfato reductoras, identificando mediante pruebas fenotípicas y filogenéticas 19 de estas; de las cuales la mayor proporción fue de la especie *Shewanella putrefaciens*, lo que sugiere una nueva diversidad microbiana que no había sido evaluada en el sistema de manantiales del Valle de la Muerte¹⁵⁷.

En 2009 Pucci y col. estudiaron las aguas marinas de la ciudad de Comodoro Rivadavia, Argentina. Las muestras fueron tomadas en tres puntos, logrando aislar 469 cepas e identificar 236 cepas, en donde el género predominante fue *Pseudomonas*, también se identificaron especies relacionadas taxonómicamente, entre las que se encuentra *Shewanella putrefaciens*, la cual se aisló solamente en tres ocasiones. La población bacteriana estuvo marcada por la contaminación que recibe los sitios de muestreo, cabe destacar que la principal contaminación de estas aguas proviene de la industria de hidrocarburos y que los microorganismos presentes en la costa poseen un importante potencial de biodegradación de este tipo de compuestos¹⁵⁸.

De lo descrito anteriormente, se puede notar que *Shewanella putrefaciens* se asocia principalmente con hábitats acuáticos marinos y de aguas minerales, gracias a su adaptabilidad metabólica, por lo que pueden ser encontrados en manantiales termales, como lo observado en el manantial termal de La Mitisús

Shewanella putrefaciens se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, por lo que su hábitat natural incluye el agua y el suelo. Se ha encontrado en todos los ambientes acuáticos que incluyen el agua dulce, de mar, ríos, manantiales termales y aguas residuales^{55,56,57,58}. También se han aislado de animales que habitan en estos ambientes; como lo son las ostras, ranas, peces, y en alimentos como la leche, mantequilla, huevos, y carne⁵⁹.

Es un microorganismo importante desde el punto de vista ecológico, debido a que participa en los procesos naturales de autodepuración ambiental, por su capacidad de utilizar como fuente de carbono y energía diferentes compuestos orgánicos⁶⁰, lo que la hace una potencial candidata a ser usada en procesos de bioremediación, en casos de contaminación por compuestos orgánicos y petróleo¹⁵⁹.

El aislamiento de *Shewanella putrefaciens* en muestras clínicas es poco frecuente, sin embargo se han asociado con ulcera cutáneas, afecciones óticas y oculares. En algunos casos se presentan bacteriemias, que pueden resultar mortales en pacientes inmunosuprimidos. Estas infecciones suceden con mayor frecuencia en países con climas cálidos o en veranos especialmente calurosos de países con climas templados¹⁶⁰.

Debido a que las aguas de los manantiales termales son usadas generalmente con fines recreativos y terapéuticos, tal como es el caso del manantial de Santa Apolonia, es de vital importancia realizar estudios que permitan determinar los microorganismo que viven en estos ambientes acuáticos, ya que la mayoría de las especies que se identificaron en estas localidades son microorganismos oportunistas que pueden causar enfermedades en las personas que hacen uso de estas aguas.

5.2.2. Determinación de la actividad antimicrobiana y antifúngica de las bacterias heterótrofas viables mesófilas aisladas e identificadas procedentes del agua de los manantiales termales de Santa Apolonia y La Mitisús, estado Mérida.

Los resultados obtenidos en este estudio evidencian que las cepas pertenecientes al complejo *Burkholderia cepacia*, aisladas de las aguas termales del Santa Apolonia (MA-MK2, MA-BHI, MP-PC, MA-MK0, MP-MK1) inhibieron el crecimiento de *Aspergillus niger* con halos de inhibición entre 16 mm a 27 mm, observándose que la cepa MA-MK2 fue la de mayor efecto antagónico contra *Aspergillus niger* entre las especies del género *Burkholderia* (Tabla 14 y 15). El comportamiento antagónico de este complejo de especies frente a hongos ha sido objeto de estudio por diversos investigadores, quienes han sugerido tres mecanismos por el cual puede ocurrir la inhibición del crecimiento fúngico por la producción de sideróforos, generación de antibióticos y competición por nutrientes^{161,162,163,164}.

La producción de compuestos antifúngicos ha sido considerado como uno de los principales mecanismos utilizados en el antagonismo de *Burkholderia cepacia*¹⁶⁵. Este microorganismo es capaz de producir compuestos antimicrobianos como cepacidina, cepacidina B, xilocandina y pirrolnitrina que inhiben el crecimiento microbiano^{166,167}. El potencial antifúngico del complejo *Burkholderia cepacia* puede atribuirse también a la producción de enzimas quitinasas, proteasas, amilasas y celulasa que pueden afectar el desarrollo del hongo¹⁶⁸.

De lo observado en el ensayo realizado para la actividad antifúngica de la especie *Burkholderia cepacia* frente *Aspergillus niger*, se puede inferir que la producción de sideróforos no está implicada en el comportamiento antagónico de las cepas bacterianas aisladas, ya que no se observó asociación entre la presencia de los halos de inhibición y la pigmentación de las mismas, es más factible que este haya ocurrido por la segregación de compuestos antifúngicos o competencia por nutrientes.

Al comparar los resultados obtenidos en este trabajo con los estudios realizados por otros autores se observa que estos son similares. En el trabajo realizado en Venezuela por Araque y col. en 2007, encontraron que cepas de *Burkholderia cepacia* aisladas de ambientes hospitalarios, eran capas de inhibir el crecimiento de diferentes hongos filamentosos entre ellos *Aspergillus niger*¹⁶⁹.

Ensayos realizados por Elshafie y col. en 2012 en Italia con especies del género *Burkholderia* frente a varios hongos, indican también que las especies de este género tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de *Aspergillus niger* y otros hongos fitopatógenos¹⁶⁸.

Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio difieren con los reportados en el 2009 por Parra y col. donde evaluaron la actividad antifúngica de cepas de *Burkholderia cepacia* aisladas de rizósfera de maíz amarillo frente a varios hongos filamentosos entre estos *Aspergillus niger* y no encontraron efecto antagónico contra este hongo, pero si contra *Trichoderma viride*, lo cual pone en manifestó la actividad antifúngica de especie¹⁷⁰.

Debido a su potencial antifúngico y antibacteriano, en los últimos años miembros del complejo *Burkholderia cepacia* han emergido como agentes de biocontrol contra hongos fitopatógenos¹⁷¹ y biorremediación^{172,173}.

Cabe destacar que la especie *Burkholderia cepacia* no presentó actividad antibacteriana contra ninguna de las cepas utilizadas como control.

Las cepas de género *Pseudomonas* MA-EAM, MA-PC de la especie *Pseudomonas fluorescens* y MA-PC/C de la especie *Pseudomonas aeruginosa*, obtenidas en las muestras del manantial termal de Santa Apolonia, también presentaron actividad antifúngica contra el hongo filamentosos *Aspergillus niger*, presentando halos de inhibición entre 16 mm y 20 mm, siendo MA-PC la de mayor actividad antifúngica (Tabla 14 y 15).

De los cepas aisladas con actividad antifúngica, solamente tres (MA-EAM, MA-PC Y MA-PC/C) presentaron actividad antibacteriana contra bacterias Gram positivas

y Gram negativas, perteneciendo en su totalidad al género *Pseudomonas* (Tabla 14 y 15).

Los halos observados de estas cepas contra *Staphylococcus aureus* ATCC25923 presentaron halos con diámetros entre 10 mm y 15 mm, siendo la cepa MA-PC/C (*Pseudomonas aeruginosa*), la de mayor efecto antagónico.

Para *Staphylococcus aureus* ATCC29213 se observó el mismo comportamiento, inhibición por todas las cepas de *Pseudomonas*, lográndose medir halos entre los 6 mm y 16 mm, presentando la mayor actividad la cepa MA-EAM (*Pseudomonas fluorescens*).

Las tres cepas (MA-EAM, MA-PC Y MA-PC/C) con actividad antibacteriana contra las bacterias Gram positivas, también presentaron un comportamiento antagónico frente a bacterias Gram negativas, en específico *Escherichia coli* ATCC25922 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC23352.

Para la cepa control *Escherichia coli* ATCC25922, se observaron halos de inhibición entre 14 mm y 17 mm, presentando el mayor halo de inhibición la cepa MA-PC (*Pseudomonas fluorescens*).

Por su parte, para la cepa *Klebsiella pneumoniae* ATCC23352, se observó poca actividad antibacteriana, observándose halos de inhibición pequeños, con diámetros entre 2 mm y 3 mm, siendo la cepa MA-PC (*Pseudomonas fluorescens*) la de mayor actividad.

De las tres cepas con actividad antimicrobiana solamente la cepa MA-PC/C (*Pseudomonas aeruginosa*), presentó actividad antibacteriana contra *Escherichia coli* ATCC25972, mostrando un halo de inhibición de 20 mm..

Es conveniente mencionar que ninguna de las cepas aisladas presentaron actividad antibacterial contra la *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853.

Se encontró que la mayoría de las cepas aisladas en el manantial termal de Santa Apolonia, tuvieron potencial antibacteriano y antifúngico, esto puede deberse

principalmente a la naturaleza de los géneros encontrados. Se conoce que las especies pertenecientes al género *Pseudomonas* aisladas de diferentes ambientes suelo, agua y muestras clínicas tienen la capacidad de generar compuestos que presentan actividades antagónicas (antibacterianas y antifúngicas)^{9,169,174,175}.

El comportamiento antifúngico y antibacterial observado en las cepas aisladas en este trabajo, pertenecientes al grupo de las *Pseudomonas* fluorescentes, pudieran explicarse fundamentalmente en función de dos factores; competencia y antagonismo directo¹⁷⁶. La competencia puede ocurrir por el nicho ecológico o por nutrientes como el hierro. La lucha por hierro genera la producción de sideróforos, los cuales participan en los mecanismos de biocontrol, efectivos en ciertos casos¹⁷⁷. Sin embargo, tiene escasa o nula importancia en otros¹⁷⁸. La actividad antagónica de estas especies puede ser justificada también por la producción de enzimas hidrolíticas como proteasa, quitinasas, celulasa y β -1,3 gluconasas¹⁷⁹, o por la producción de compuestos antibióticos como pioluteorina, pirrolnitrina y derivados de fenazina¹⁷⁶.

En los ensayos realizados se observó que en algunas placas alrededor del pozo donde se sembraron las cepas MA-EAM, MA-PC (*Pseudomonas fluorescens*) y MA-PC/C (*Pseudomonas aeruginosa*), se produjo una pigmentación verde, y alrededor de la misma no hubo desarrollo de las cepas control, por lo que se podría suponer que una de las causas de la actividad antagónica observada en las cepas aisladas, puede deberse a la producción de un compuesto sideróforo (pioverdina).

En el 2010 Barrios, determinó la presencia de sustancias extracelulares antagónicas en 10 cepas de *Pseudomonas* spp. aisladas de la cuenca del río Manzanares, de las que obtuvo tres cepas con actividad antagónica contra *Escherichia coli* K12 CVCN 131, *Staphylococcus aureus* CVCN 636 y otras especies¹⁷⁴; resultados similares a los hallados en este trabajo, ya que en ambos hubo inhibición del crecimiento de bacterias Gram positivas y Gram negativas.

En el estudio realizado en Uruguay en 2012 por Riera, para purificar y caracterizar un metabolito producido por *Pseudomonas fluorescens*, se determinó que este tenía propiedades antagónicas contra hongos fitopatógenos y bacterias Gram positivas¹⁸⁰. Este trabajo al igual que lo reportado en este estudio, pone en manifiesto el potencial antagónico que posee la especie *Pseudomonas fluorescens*.

El estudio realizado en Venezuela por Mora en el 2013 con cepas de *Pseudomonas. fluorescens* aisladas de la rizósfera del pimentón, mostraron efectos antifúngicos frente a diferentes hongos ambientales y generaron actividad antibacterial contra bacterias Gram positivas y Gram negativas¹⁸¹. Al comparar los resultados obtenidos por Mora, con los obtenidos en este estudio, se observa que hay una correlación entre ellos, ya que en ambos trabajos se encontró que las cepas aisladas *Pseudomonas fluorescens* tienen efectos antifúngicos e inhiben bacterias Gram negativas y Gram positivas.

Manwar y col. en 2004, estudiaron muestras de aguas de mar en el estado de Goa, India, logrando aislar una bacteria del grupo de las *Pseudomonas* fluorescentes, con la habilidad de producir un sideróforo del tipo pioverdina en condiciones de deficiencia de hierro. La cepa bacteriana fue identificada mediante técnicas fenotípicas y bioquímicas como *Pseudomonas aeruginosa*, la cual presentó actividad antifúngica contra diversos hongos fitopatógenos de plantas, entre los que se encuentra *Aspergillus niger*, lo que concuerda con lo observado en las pruebas de actividad antifúngicas realizadas en este estudio para *Pseudomonas aeruginosa*, la cual también inhibió el crecimiento del fitopatógeno *Aspergillus niger*¹⁸².

Paralelamente, Benincasa y col. en 2004, estudiaron la actividad de un nuevo producto ramnolípido producido por una cepa aislada de muestras de suelo contaminadas con petróleo en Brasil, identificada como *Pseudomonas aeruginosa*. Este compuesto resultó presentar actividad antibacterial contra una serie de bacterias de los géneros *Staphylococcus*, *Bacillus* y *Pseudomonas*, así como actividad antifúngica contra una serie de fitopatógenos entre los que se encuentra

Aspergillus niger, lo que se asemeja con los resultados obtenidos en este estudio¹⁸³.

Al comparar los resultados obtenidos en este estudio, con los conseguidos en 2009 por Morales, se observan ciertas similitudes. El encontró en el análisis realizado con cepas *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de coprocultivos de niños en el estado Sucre, que dos de los aislados tenían efecto antagónico frente a cepas *Escherichia coli* K12 CVCM 131 y otros bacilos Gram negativos¹⁷⁴, comportamiento que también se observó en las cepas aisladas en este trabajo. Sin embargo, estos resultados difieren con respecto a que en el estudio realizado por Morales, no se observó actividad antibiótica frente *Staphylococcus aureus*, mientras que este estudio, si se obtuvo actividad antagónica frente a esta bacteria Gram positiva. Inclusive se observó actividad frente a *Staphylococcus aureus* 29213. Estas discrepancias podría atribuirse, al hecho que las cepas tienen distintos sitios de origen, por lo tanto podrían comportarse de forma diferente.

Estudios realizados en 2012 por Mukherjee y col, señalan haber caracterizado un metabolito verde producido por *Pseudomonas aeruginosa*, capaz de inhibir el crecimiento de bacterias Gram negativas de su misma especie así de otras especieas tal como *Escherichia coli*⁹. Lo que pone en manifiesto, al igual que este trabajo el potencial antagónista de la especie *Pseudomonas aeruginosa*.

5.2.3. Actividades enzimáticas de las especies bacterianas aisladas del agua de los manantiales termales de Santa Apolonia y La Mitisús, estado Mérida.

Los pruebas de actividad enzimática reflejan que las cepas aisladas en el manantial termal de Santa Apolonia, que presentaron actividad enzimática amilolítica, pertenecieron a la especie *Burkholderia cepacia* (MA-MK2, MA-BHI y MP-PC) y la especie *Pseudomonas fluorescens* (MA-EAM y MA-PC), lo que representaron el 55,55% de las cepas aisladas en este manantial (Tabla 17).

De dichas pruebas enzimáticas, realizadas a las cepas aisladas en el manantial termal de Santa Apolonia, se pudo observar que seis cepas, lo que represantaron el 66,66%, tienen la capacidad de producir enzimas proteolíticas. Las cepas con

esta característica pertenecieron a la especie *Burkholderia cepacia* (MA-MK2, MA-BHI y MA-MK0), la especie *Pseudomonas fluorescens* (MA-EAM y MA-PC) y la especie *Pseudomonas aeruginosa* (MA-PC/C) (Tabla 18).

Trabajos realizados en manantiales de aguas termales de diferentes balnearios como Puente Viesgo¹⁰⁴, Cervantes¹³², Alhama¹⁰⁹ y La Toja¹¹⁰ todos ubicados en España, señalan haber encontrado que la mayor proporción de microorganismo con actividades amilolíticas y proteolíticas está compuesto principalmente por bacterias de los géneros *Burkholderia* y *Pseudomonas*, lo que es similar a los resultados obtenidos en este estudio; ya que los microorganismos aislados del Manantial termal de Santa Apolonia que manifestaron estas actividades también pertenecen a dichos géneros (*Burkholderia* y *Pseudomonas*).

Estos investigadores, señalan que las bacterias proteolíticas y amilolíticas están ampliamente distribuidas en la naturaleza y corresponden a especies mesófilas y termófilas muy diversas, encontrándose en las aguas naturales donde desempeñan un papel fundamental en los ciclos biogeoquímicos del carbono y nitrógeno, transformando compuestos orgánicos. De esta manera proporcionan los nutrientes esenciales para la viabilidad y equilibrio del ecosistema, así como contribuyen a la depuración de los contaminantes orgánicos, razón por la cual son comúnmente encontrados en manantiales mineromedicinales hipotermas, mesotermas e hipotermas^{104,132,109,110}.

Las enzimas amilasa y proteasas generadas por microorganismo son de gran importancia a nivel industria, por lo que se utilizan actualmente en diferentes aplicaciones. Por ejemplo, las proteasa son usadas en la industria cárnica como ablandadoras de carne y las amilasas son comúnmente empleadas en la industria alimentaria para la obtención de jarabes de glucosa y fructuosa, empleados en la preparación de bebidas refrescantes³².

Las proteasas y amilasas también son ampliamente utilizadas como aditivos en detergentes para lavar ropa, debido a su potencial para eliminar manchas²⁹.

Por otra parte, la gran versatilidad nutricional de los géneros *Pseudomonas* y *Burkholderia* les permiten degradar substratos aromáticos clorados (compuestos tóxicos encontrados en pesticidas), que utilizan como fuente de carbono y energía; por lo que pueden también ser utilizadas en biorremediación ambiental^{184,185,186}.

Las enzimas producidas por este tipo de microorganismos han sido objeto de recientes investigaciones por sus posibles aplicaciones en biotecnología, sin embargo estas actividades metabólicas han sido poco estudiadas en microorganismos aislados de aguas minerales¹³².

Como se puede observar el manantial termal de Santa Apolonia representa una fuente potencial de recursos biotecnológicos, ya que más de la mitad de las cepas aisladas en este ambiente termal, presentaron actividad enzimática amilolítica y proteolítica de posible interés industrial.

Es importante señalar, que aunque las cepas aisladas en el manantial termal de La Mitisús no presentaron actividad en las pruebas enzimáticas realizadas, se aislaron cepas de los géneros *Ralstonia*, *Shewanella* y *Comamonas*, las cuales se han reportado con capacidad de degradar compuestos aromáticos como benceno, etilbenceno, toluenos y o-xilenos, contaminantes típicos de la industria del petróleo, por lo que son potenciales candidatas a ser utilizadas en tratamientos de biorremediación ambiental^{31,55,187}.

5.2.4. Perfil de susceptibilidad a los antibióticos de las cepas bacterianas identificadas procedentes de las aguas de los manantiales termales de Santa Apolonia y La Mitisús, estado Mérida.

De los ensayos de susceptibilidad de las cepas aisladas de los manantiales estudiados en este trabajo; se observó que el 100% de las especies de los géneros *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Comamonas*, *Ralstonia* y *Shewanella* son sensibles a la mayoría de los antibióticos utilizados, entre los que encontramos: Azetreonam, Gentamicina, Amikacina, ácido Nalidíxico, Ciprofloxacina, Piperacilina y Cefepime (Tabla 19).

Se observó que todas las cepas fueron sensibles para siete de los ocho antibióticos utilizados, esto puede atribuirse al hecho de que estas cepas son de origen ambiental. Por lo que podría inferirse que el hábitat donde dichas especies se desarrollaron, no ha sido sometido a factores que induzcan un mecanismo de resistencia por parte de estos microorganismos contra antibióticos.

Paralelamente se observó que la totalidad de las especies encontradas en los dos manantiales examinados en este estudio, fueron resistentes a la mezcla Amoxicilina/ácido Clavulánico (Tabla 19), debido posiblemente a una mutación inducida por la exposición durante el ensayo de estos microorganismos a la amoxicilina/ácido Clavulánico. Se sabe que las BGNNF tiene la capacidad de producir betalactamasas de tipo AmpC que son serin-betalactamasas de naturaleza cromosómica inducible, responsables de la resistencia habitual de las BGNNF a las aminopenicilinas y las aminopenicilinas combinadas con inhibidores de betalactamasa¹³⁴. Esto constituye un reporte importante sobre la naturaleza mutagénica de estas bacterias, por lo que imperan estudios más profundos sobre el tema.

Rosenberg y col. en 1989, estudiaron 87 marcas de aguas minerales a la venta en Alemania, con el objeto de determinar la presencia de bacterias heterótrofas, específicamente especies *Pseudomonas* resistentes a antibióticos, obteniendo 81 cepas provenientes de 39 muestras. En ellas se determinó la presencia de las especies *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas fluorescens*, entre otras. Estas especies fueron resistentes a la mayoría de los antibióticos, entre los que se encontraban Cloranfenicol, Ampicilina, Gentamicina, ácido Nalidíxico y Tetraciclina. Sin embargo, *Burkholderia cepacia* fue sensible al ácido Nalidíxico y *Pseudomonas fluorescens* fue sensible a la Gentamicina¹⁸⁸.

En 1995, Massa y col. estudiaron ocho marcas de aguas minerales no carbonatadas en Italia, realizándole pruebas de susceptibilidad antimicrobiana a 11 especies del género *Pseudomonas spp.* Observando que todas ellas eran resistentes a Ampicilina, Estreptomicina, Carbenicilina, Tetraciclina, Cotrimoxazol, Gentamicina y Cloranfenicol¹⁸⁹.

Mary y col. en 2000, estudiaron cinco marcas de aguas minerales francesas, con el objeto de determinar bacterias heterótrofas con resistencia múltiple antimicrobiana (Amoxicilina, Aztreonam, ácido Nalidíxico, Ciprofloxacina, Gentamicina, Amikacina y Piperacilina), encontrado diferentes cepas de *Comamonas testosteroni*, las que presentó comportamiento variado dependiendo de la marca de agua de la cual fue aislada. La cepa aislada en la marca E fue resistente a todos los antibióticos evaluados; la cepa aislada de la marcas A y B presentaron resistencia a Aztreonam y ácido Nalidíxico, adicionalmente la cepa de la marca B presentó resistente a Ampicilina y Piperacilina¹.

En el 2005, Messi y col. en Italia lograron aislar 120 cepas aisladas provenientes de aguas minerales, con el objeto de determinar la actividad antimicrobiana y la resistencia antibiótica. Entre las especies aisladas e identificadas se encontraron predominantemente *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas aeruginosa* y con baja frecuencia de *Burkholderia cepacia*, observando que cerca del 80% de los aislados presentaron resistencia a los diferentes antibióticos evaluados, entre los que se encontraban Ampicilina, Gentamicina, Amikacina y ácido Nalidíxico, y solo el 55% de las cepas aisladas resultaron ser multiresistentes¹⁹⁰.

Tiroadismo y col. en 2010, lograron aislar diferentes cepas de la especie *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de muestras de agua de piscinas en el norte de Grecia, las cuales fueron sensibles a diversos antibióticos como Aztreonam, Ciprofloxacina, Gentamicina, Amikacina y Cefepima¹⁹¹.

En el mismo contexto, Alvarez en el 2011, estudio la susceptibilidad *in vitro* de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de aguas del río Manzanares, Venezuela, reportando que las cepas aisladas presentaron resistencia a los antibióticos Aztreonam, Tazobactam, Cefepima, entre otros¹⁹².

Finalmente en 2012, Ullah y col. realizaron una investigación en Pakistán, donde se estudio la presencia de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* en aguas minerales y sus perfiles de resistencia antimicrobiana, en este se señala la

presencia de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a una gran diversidad de antibióticos con una alta prevalencia de cepas multiresistentes¹⁹³.

Al comparar los resultados obtenidos para las cepas aisladas en los manantiales termales estudiados en este trabajo, con los diferentes estudios reportados en la literatura; se puede observar una variabilidad de los comportamientos de las BGNNF respecto a la resistencia de estos microorganismos frente a los antibióticos comúnmente utilizados en los laboratorios clínicos. Por lo que es difícil establecer una relación ambiente-resistencia antibiótica de los aislados de aguas subterráneas, minerales y superficiales; ya que el ambiente en sí, puede influenciar la variabilidad genética de las bacterias, induciendo diferentes mecanismos de resistencia en cada uno de los microorganismos.

www.bdigital.ula.ve

Conclusiones

- ✓ Se aislaron un total de 21 colonias bacterianas del agua de los dos manantiales termales estudiados.
- ✓ La mayor proporción de las bacterias aisladas en las muestras de agua tomadas en ambos manantiales está compuesta principalmente por bacterias Gram negativas y baja presencia de bacterias Gram positivas.
- ✓ Las bacterias Gram negativas encontradas en el agua de ambos manantiales tienen un metabolismo no fermentativo, por lo que se clasificaron como bacterias Gram negativas no fermentadoras (BGNNF).
- ✓ Empleando el sistema de identificación comercial API® 20NE, se identificaron a nivel de género y especie 18 colonias (BGNNF) aisladas del agua de ambos manantiales.
- ✓ Utilizando pruebas bioquímicas se logró identificar a nivel de género tres colonias de bacterias Gram positivas aisladas del agua de ambos manantiales.
- ✓ Los géneros encontrados en el agua del manantial termal de Santa Apolonia fueron *Burkholderia*, *Pseudomonas* y *Staphylococcus*, el género encontrado con mayor frecuencia fue *Burkholderia*.
- ✓ Los géneros aislados en el agua del manantial termal de La Mitisús, fueron *Comamonas*, *Ralstonia*, *Pseudomonas*, *Shewanella* y *Staphylococcus*, siendo el género encontrado con mayor proporción *Comamonas*.
- ✓ Las especies bacterianas identificadas en el agua del manantial termal de Santa Apolonia fueron *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas aeruginosa*, y la especie encontrada con mayor frecuencia fue *Burkholderia cepacia*.

- ✓ Las especies bacterianas identificadas en el agua del manantial termal de La Mitisús fueron; *Comamonas testosteroni*, *Ralstonia pickettii*, *Pseudomonas stutzeri* y *Shewanella putrefaciens*, siendo la especie encontrada en mayor proporción *Comamonas testosteroni*.
- ✓ Este trabajo constituye el primer reporte de aislamiento de *Ralstonia pickettii*, *Shewanella putrefaciens* y *Comamonas testosteroni* en aguas termales de Venezuela.
- ✓ Se encontró que las especies *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas aeruginosa* aisladas del agua del manantial termal de Santa Apolonia presentaron potencial antibacteriano contra *Staphylococcus aureus* ATCC25922, *Staphylococcus aureus* ATCC29213, *Escherichia coli* ATCC25922, *Escherichia coli* ATCC25972, *Klebsiella pneumoniae* ATCC233552 y actividad antifúngica frente *Aspergillus niger*.
- ✓ Las especies *Burkholderia cepacia* y *Pseudomonas fluorescens* del manantial termal de Santa Apolonia presentaron actividad enzimática amilolítica.
- ✓ Las especies *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas aeruginosa* del manantial termal de Santa tienen la capacidad de generar enzimas proteolíticas.
- ✓ Se encontró que las especies del género *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Comamonas*, *Ralstonia* y *Shewanella* aisladas del agua de los manantiales de Santa Apolonia y La Mitisús son sensibles los antibióticos Azetreonam, Ácido Nalidixico, Ciprofloxacina, Gentamicina, Amikacina, Piperacilina y Cefepime.

- ✓ Se observó que todas especies de los géneros *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Comamonas*, *Ralstonia* y *Shewanella* fueron resistentes al antibiótico Amoxicilina/ácido Clavulánico.

www.bdigital.ula.ve

Recomendaciones

- ✓ Realizar estudios microbiológicos con la finalidad de conocer la microbiota que conforma la cada uno de los manantiales estudiados.
- ✓ Hacer análisis microbiológicos para establecer parámetros de calidad sanitaria, especialmente en el manantial termal de Santa Apolonia; ya que las aguas de este afluente son usadas con fines recreacionales y medicinales.
- ✓ Realizar análisis moleculares que permitan corroborar la identidad de las especies aisladas.
- ✓ Ejecutar trabajos que permitan identificar, medir y caracterizar los posibles compuestos metabólicos producidos por las especies que presentaron actividad antibacteriana y antifúngica.
- ✓ Hacer análisis cuantitativo que permitan conocer el potencial enzimático que tienen las especies que presentaron actividades amilolíticas y proteolíticas.
- ✓ Realizar estudios que permitan determinar si las especies *Burkholderia cepacia*, *Ralstonia pickettii* y *Shewanella putrefaciens* tienen capacidad de degradar sustratos aromáticos.
- ✓ Desarrollar trabajos que permitan determinar la producción de serin-betalatasas en los compuestos que presentaron resistencia a la Amoxicilina/ácido Clavulánico.

Bibliografía

1. Mary, P., Defives, C., Hornes, J. (2000). Occurrence and Multiple Antibiotic Resistance Profiles of Non-fermentative Gram-Negative Microflora in Five Brands of Non-carbonated French Bottled Spring Water. *Microb Ecol.* 39: 322–329.
2. De la Rosa, M., Mosso M. (2000). Diversidad microbiana de las aguas termales. *Panorama actual de la aguas Minerales y Minero – Medicinales en España.* 153-158.
3. Clardy, J., Fischbach, M., Walsh, W., (2006). New antibiotics from bacterial natural products. *Nature Biotechnology.* 24(12):1541-1550.
4. Bredholdt, H., Galatenko, O., Engelhardt, K., Fjærvik, E., Terekhova, L., Zotchev, S. (2007). Rare actinomycete bacteria from the shallow water sediments of the Trondheim fjord, Norway: isolation, diversity and biological activity. *Environmental Microbiology.* 9(11):2756–2764.
5. Pakpictcharoen, A., Potivejkul, K., Kanjanavas, P., Aeekit, S., Chansiri, K. (2008). Biodiversity of thermotolerant *Bacillus* sp. Producing biosurfactantes, biocatalysts, and antimicrobial agents. *Science Asia.* 34: 424-431.
6. Shell, C., Sparo, M., De Luca, M., Grenóvero, S., De Michele, D., Giancomino, M., Monasterio, A., Belderrain, A., Basualdo, J. (2008-2010). Actividad inhibitoria de la fase líquida del fango termal de Copahue (Neuquén, Argentina) sobre cepas de *Sptaphylococcus aureus*. *Anales de Hidrología Médica.* 3:21-33.
7. Saikia, R., Gogoi, D., Mazumder, S., Yadav, A., Sarma, R., Bora, T., Gogoi, B. (2011). *Brevibacillus lacterosporus* strain BPM3, a potential biocontrol agent isolated from a natural hot water spring of Assam, India. *Microbiological Research.* 166:216-225.
8. Pallavi, P., Jain, R., Mahajan G. (2011). Anti-infective potential of hot-spring bacteria. *Journal of Global Infectious Diseases.* 3(3):241-245.
9. Mukherjee, S., Saha, A., Ram, A., Chowdhury, A., Mitra, A. (2012). Identification and characterization of a green pigment producing bacteria

- isolated from Bakreshwar hot spring, West Bengal, India. *International Journal of Environmental Sciences and Research*. 2(1):126-129.
10. Viviano, F., Medina, L., Ramos, N., Amaíz, L., Valbuena, O. (2010). Degradación de celulosa por bacterias de aguas termales de Las Trincheras, Venezuela. *Rev. Latinoam. Biotecnol. Amb. Algal*. 2(1):18-29.
 11. Gutiérrez, R., Alvaro, V., Terrazas, L., Alvarez, M. (2007). Aislamiento y cultivo de bacterias sulfato reductoras acidófilas para la producción de sulfuro biogénico para la precipitación de metales pesados. *Biofarbo*. 15(1):5-12.
 12. Posada, Y., Pachón, L., Agudelo, A., Álvarez, E., Díaz, C., Fardeau, M., Joulian, C., Ollivier, B., Baena, S. (2004). Cuantificación, aislamiento e identificación de comunidades anaerobias amilolíticas en un manantial termomineral de Paipa Boyáca. *Revista Colombiana de Biotecnología*. VI(2): 90-100.
 13. Cuellar, M., Delgado, Y., Rincón, M. (2007). Aislamiento y Caracterización de Microorganismos Termófilos de Fuentes Termales del Municipio Ayacucho estado Táchira. Trabajo de grado. Departamento de Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Facultad de Farmacia y Bioanálisis
 14. Sheble, I., El-diwany, A. (2007). Isolation and Identification of New Cellulases Producing Thermophilic Bacteria from an Egyptian Hot Spring and Some Properties of the Crude Enzyme. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. 1(4):473-478.
 15. Alarcón, F., Correa, W. (2009). Aislamiento y Caracterización de Microorganismos Termófilos Presentes en la Fuente Termal de Aguas Caliente estado Táchira. Trabajo de grado. Departamento de Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Facultad de Farmacia y Bioanálisis
 16. Fooladi, J., Sajjadian, A. (2010). Screening the thermophilic and hyperthermophilic bacterial population of three Iranian hot-springs to detect the thermostable α - amylase producing strain. *Iran Journal Microbiology*. 2(1):49-53.

17. Navas, L., Amadio, A., Fuxan, I., Zandomeni, R. (2010). Identificación de enzimas provenientes de aislamientos de bacterias termofílicas. Trabajo presentado en el Congreso Mundial y Exposición Ingeniería. Buenos Aires, Argentina.
18. Burguera, J., Burguera, M., Sampol, M. (1981). Descripción Geológica y Relación Mineralógica de Las Fuentes de Aguas Termales del estado Mérida. *Geotermia*. 1 al 5 (3): 26 -46.
19. Boussingault, J. (1849). Viajes científicos a los Andes ecuatoriales. (Ed. Facimilari). Paris: Lasserre. pp 83-88.
20. Prol, L. (1988). El calor de la tierra. Las manifestaciones termales en la superficie de la tierra II. Obtenida el 8 de mayo de 2012 de:
www.bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/html/ciencias.html
21. Burguera, J., Burguera, M., Andressen, R., Sampol M. (1982). Aguas termales del estado Mérida. *Geotermia*. 6 al 10(8):25-36.
22. Rodríguez, R. (1998). Características de las aguas minerales y medicinales de Cuba. *Acta geológica hispánica*. 33(1-4):373-393.
23. Pricajan, A. (1982). La geología en la investigación y valoración de las aguas minerales y termales. *Geotermia*. 6 al 10(7):12-20.
24. Duque, G. (2003). *Manual de geología para ingenieros*. Universidad Nacional de Manizales, Colombia. 407-409.
25. Alvarez, F. (1850). Manual de las aguas minerales de España y principales del extranjero. Obtenido el 15 de agosto de 2013 de:
<http://books.google.com.br/books?hl=es&lr=&id=zEMrbHenkSsC&oi=fnd&pg=PA1&dq=manual+de+aguas+termales&ots=yZLMBDNull&sig=Yvgil9Aihgk6K03HJEibrw4azdg#v=onepage&q&f=false>
26. Dirección de Hidrología y Aguas Subterráneas. La composición química de las aguas subterráneas naturales. Obtenido el 14 de diciembre de 2013 de
http://aguas.igme.es/igme/publica/libro43/pdf/lib43/1_1.pdf
27. De la Rosa, M., Pintado, C., Rodríguez, C., Mosso, M. (2009). Microbiología de los mantos mineromedicinales del Balneario de Alicúm de las Torres. *An. R. Acad. Nac. Fam.* 75:763-780.

28. De la Rosa, M., Mosso, M., Vivar, M., Arrollo, G. (1995). Microbiología de las aguas mineromedicinales del Balneario de Blancafort. *An. R. Acad. Nac. Fam.* XXI:45-52.
29. Madigan, M., Martinco, J., Parker, J. (1998). *Biología de los microorganismos*. (8ª Ed). Madrid, España: PRENTICE HALL. pp 162-981.
30. Mosso, M., Sánchez, M., De la Rosa, M. (2002). Microbiología del agua mineromedicinal de los Balnearios de Alhama de Granada. *An. R. Acad. Nac. Fam.* XXVI:46-76.
31. Tortora, G., Funke, B., Case, C. (2007). *Introducción a la Microbiología* (9ª Ed). Buenos Aires, Argentina: Medica Panamericana. pp 331-622.
32. Murray, P., Rosenthal, K., Pfaller, M. (2009). *Microbiología Médica* (6ª Ed). Madrid, España: ELSEVIER. pp 209-334.
33. Wiinn, W., Allen, S., Janda, W., Koneman, E., Procop, G., Schreckenberger, P., Woods G. (2008). *Diagnóstico Microbiológico*. (6ª Ed), Argentina. editorial Panamericana. pp 306-315.
34. Algorta G. Educa Madrid, Consejería de Educación, Juventud y Deporte. Bacilos Gram Negativos No Exigentes Enterobacteriaceae, Vibrionaceae, *Pseudomonas*. Obtenida el 16 de diciembre 2013 de <http://www.educa2.madrid.org/web/educamadrid/principal/files/6046b373-a0b6-4737-8f6b-4553dfefcd53/21.-%20Enterobacterias,%20Vibrios%20y%20Pseudomonas.pdf>
35. Soberón, G. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. *Pseudomonas aeruginosa*. Obtenido el 16 de diciembre de 2013 de <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap3/>
36. Richard, A., Rossignol, G., Comet, J., Bernot, G., Guespin-Michel J., Merieau, A. (2012). Boolean Models of Biosurfactants Production in *Pseudomonas fluorescens*. *Boolean Models of Biosurfactants Production*. 7(1):1-8.
37. Universidad de Granada, Diversidad microbiana y taxonomía. Obtenida el 16 de diciembre de 2013 de

http://www.diversidadmicrobiana.com/index.php?option=com_content&view=article&id=127&Itemid=121

38. Leclerc, H., Moreau, A. (2002) Microbiological safety of natural mineral water. *FEMS Microbiol. Rev.* 26:207-222
39. WARD, B. (1996). Nitrification and ammonification in aquatic systems. *Life Support Biosph. Sci.* 3:25-29.
40. Ryana, M., Pembrokeb, J., Adleya, C. (2006). *Ralstonia pickettii*: a persistent Gram-negative nosocomial infectious organism. *Journal of Hospital Infection.* 62:278–284.
41. Mosso, M., Sánchez, M., Pintado, C., Rodríguez, C., De la Rosa, M. (2008). Microbiología de las aguas mineromedicinales del Balneario Valdelateja. *An. R. Acad. Nac. Fam.* 74:505-521.
42. Ryana, M., Pembrokeb, J., Adleya, C. (2007). *Ralstonia pickettii* in environmental biotechnology: potential and applications. *Journal of Applied Microbiology.* 103:754–764.
43. Frías, J. (2008). *Burkholderia cepacia* (*B. cepacia*). Nuevo patógeno de infecciones nosocomiales. *ENF. INF:MICROBIOL.* 28(1):19-23.
44. González, N., Hernández, G., Castañeda, J., Barbosa, P., Lombardo, E., Girón J. (2008). Brotes de *Burkholderi cepacia* en el instituto Nacional de Pediatría. *Acta Pediatr. Mex.* 29(4):185-188.
45. Mosso, M. Sánchez, M., De la Rosa, M. (2002). Microbiología del Agua Mineromedicinal de Alhama Granada. *An. R. Acad. Nac. Fam.* 26:46-76.
46. Reddy, A., Murthy, S., Jalali, S., Gopinathan, U. (2009). Post-operative endophthalmitis due to an unusual pathogen, *Comamonas testosterone*. *Journal of Medical Microbiology.* 58:374-375.
47. Kersters, K., De Vos, P., Gillis, M., Swings, J., VanDamme, P., Stackebrandt, E. (2006) Introduction to the Proteobacteria. *Prokaryotes.* 5:3-37.
48. De la Rosa, M., Andueza, F., Sánchez, M., Rodríguez, M., Mosso, M., (2004). Microbiología de las aguas mineromedicinales de los Balnearios de Jaraba. *An. R. Acad. Nac. Fam.* 70:521-542.

49. Farshad, S., Norouzi, F., Aminshahidi, M., Heidari, B., Alborzi, A. (2012). Two cases of bacteremia due to an unusual pathogen, *Comamonas testosteroni* in Iran and a review literatura. *J Infect Dev Ctries*. 6(6):521-525
50. Ma, Y., Zhang, Y., Zhang, J., Chen, D., Zhu, Y., Zheng, H., Wang, J., Jiang, C., Zhao, G., Liu, S. (2009). The Complete Genome of *Comamonas testosteroni* Reveals Its Genetic Adaptations to Changing Environments. *Applied and Environmental Microbiology*. 75(21):6812–6819
51. Lessner, D., Parales, R., Narayan, S., Gibson, D. (2003). Expression of the Nitroarene Dioxygenase Genes in *Comamonas* sp. Strain JS765 and *Acidovorax* sp. Strain JS42 Is Induced by Multiple Aromatic Compounds. *Journal of Bacteriology*. 185(13):3895–3904.
52. Tamaoka, J., Ha, D., Komagata, K. (1987). Reclassification of *Pseudomonas acidovorans* den Dooren de Jong 1926 and *Pseudomonas testosteroni* Marcus and Talalay 1956 as *Comamonas acidovorans* comb. nov. and *Comamonas testostersni* comb. nov., with an Emended Description of the Genus *Comamonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 37(1):52-59.
53. Molina, E., Ureña, S., Ramírez, A., Oropez, G. (2009). *Shewanella algae* en un paciente con diarrea crónica. Primer caso en Costa Rica. *Acta méd. Costarric*. 51(3):172-174.
54. Silva, A., Batista, W., Ferreira, J., Barbosa, A., Hofer, H., Graça, E. (2010). *Shewanella putrefaciens* en lesión cutánea traumática. *Rev Pan-Amaz Saude*. 1(3):125-128.
55. Hau, H., Gralnick. (2007). Ecology and Biotechnology of the Genus *Shewanella*. *Annu. Rev. Microbiol*. 61:237–58.
56. Soon, H., Kum, k., Kim, E., Lee, H., Choe, K., Don, M. (2008). Outbreak of *Shewanella algae* and *Shewanella putrefaciens* Infections Caused by a Shared Measuring Cup in a General Surgery Unit in Kore. *Infect. Control Hosp. Epidemiol*. 29(8): 742-748.

57. Pagani, L., Lang, A., Vedovelli, C., Moling., Rimenti, G., Pristerà, R., Mian, P. Soft Tissue Infection and Bacteremia Caused by *Shewanella putrefaciens*. *Journal of Clinical Microbiology*. 41(5):2240-2241.
58. Ghos, D., Bal, B., Kashyap, V., Pal, S. Molecular Phylogenetic Exploration of Bacterial Diversity in a Bakreshwar (India) Hot Spring and Culture of *Shewanella*-Related Thermophiles. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(7):4332-4336.
59. Wang, I., Lee, M., Chen, Y., Huang, C. (2004) Polymicrobial Bacteremia Caused by *Escherichia coli*, *Edwardsiella tarda*, and *Shewanella putrefaciens*. *Chang. Gung. Med. J.* 27:701-705
60. Petrovskis, E., Vogel, T., Adriaens, P. (1994). Effects of electron acceptors and donors on transformation of tetrachloromethane by *Shewanella putrefaciens* MR-1. *Microbiology Letters*. 121:357-364
61. Kloos, W. (1980). Natural Populations of the Genus *Staphylococcus*. *Ann. Rev. Microbiol.* 34:559-92.
62. Ramirez, N., Serrano, J., Sandoval, H. (2006). Microorganismo extremófilos, Actinomicetos halófilos en México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 37(3):56-71.
63. Niehaus, F., Bertoldo, c., Kähler, M., Antranikian, G. (1999). Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 51:711-729.
64. Kumar, S., Nussinov, R. (2001). How thermophilic proteins deal with heat. *CMLS, Cell Mol Life Sci.* 58:1216–1233.
65. Nuñez, C., Vives, F., Hermosillo, O., Alazard, D., Linares, L. (2004). La vida a altas temperaturas. *Revista de la Academia Mexicana de Ciencias*. 55(1):56-65.
66. Szilágyi, A., Závodszky, P. (2000). Structural differences between mesophilic, moderately thermophilic and extremely thermophilic protein subunits: results of a comprehensive survey. *Structure*. 8(5):493-504.
67. Pakpictcharoen, A., Potivejkul, K., Kanjanavas, P., Aeekit, S., Chansiri, K. (2008). Biodiversity of thermotolerant *Bacillus* sp. Producing

- biosurfactantes, biocatalysts, and antimicrobial agents. *Science Asia*. 34:424-431.
68. Prescott, L., Harley, J., Klein, D. (1999). *Microbiología*. (4ª Ed). Madrid, España: McGraw Hill. pp 183-995.
69. Prescott, S., Dunn, C. (1962). *Microbiología industrial*. (3ª Ed). Madrid, España: Aguilar, S.A. pp 523-530
70. Mathews, C., Holde, K. (2000). *Bioquímica*. (3ª Ed). Madrid, España: McGraw Hill. pp 155.
71. Hasan, F., Shah, A., Hameed A. (2006). Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*. 39(2):235-251.
72. Chacón, O., Waliszewski, K. (2005). Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. *Universidad y Ciencia*. 21(42):113-122.
73. Singleton, P. (2004). Bacterias en biología biotecnología y medicina. Zaragoza, España: ACRIBIA, S.A. pp 345-352.
74. Asgher, M., Javaid, M., Rahman, S., Legge, R. (2007). A thermostable α -amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. *Journal of Food Engineering*. 79:950-955.
75. Ramirez, N., Sandoval, A., Serrano, J. (2004). Las bacterias halófilas y sus aplicaciones biotecnológicas. *Rev. Soc. Ven. Microbiol*. 24:(1-2):12-23.
76. Gomes, J., Steiner, W. (2004). The biocatalytic Potential of Extremophiles and Extremozymes. *Food Technol. Biotechnol*. 42(4):223-235.
77. Burg, B. (2003). Extremophiles as a source for novel enzymes. *Ecology and Industrial Microbiology*. 6:213-218.
78. Todar, K., Online Textbook of Bacteriology. Obtenida el 29 de agosto de 2012 de http://textbookofbacteriology.net/kt_toc.html
79. Pdvsa-Intevep. (1997). Fuentes de Aguas Termales en Venezuela. Obtenida el 21 de mayo de 2012 de www.pdv.com/lexico/menes/aguter.htm
80. Schubert, C. (1980). Información Sobre Diversas Manifestaciones Geotérmicas. *Geotermia*. 1 al 5(2):1-3.

81. Burguera, L., Burguera, M., Sampol, M. (1981). Descripción Geológica y Relación Mineralógica de Las Fuentes de Aguas Termales del estado Mérida. *Geotermia*. 1 al 5(4):26-41.
82. Doudelet, A. (1981). Estudio Sobre Las Aguas Minerales. *Geotermia*. 1 al 5(3):5-28.
83. Burguera, J., Burguera, M., Silva, J., Usubillaga, A., Días, C., Ballester, L. (1982). Fuentes de aguas minerales del estado Mérida. Farmacología, Ecología y análisis Bacteriológico. *Geotermia*. 6 al 10(7):21-28.
84. Burguera, J., Burguera, M., Millan, F. (1981). Estudios de Las fuentes de Aguas Termales del estado Mérida. *Geotermia*. 1 al 5(4):41-46.
85. Barrientos, Y., González, D., Urbani, F. (2000). Estudios hidroquímicos de los manantiales Cumbotico y Cumbote, Colonia Tovar, estado Aragua, Venezuela. *Ecotropicos*. 13(2):81-89.
86. Avila, I., Rodríguez, M., Infante, D., Llovera, V., Álvarez, O., Briceño, M. (2006). Amibas de vida libre potencialmente patógenas en aguas del parque "Las Cocuizas", Maracay, Venezuela. *Rev Cubana Med Trop*, 58(1):19-24.
87. Moreno, C., Días, J., Caraballo, H., Chacón, K., Batista J. (2007). Caracterización Hidrogeoquímica de las Fuentes de Aguas Termales del estado Trujillo Venezuela. *Academia*. IV(12): 92-105.
88. Ortiz, E., Coya, L., González, L., Graña, L., Pérez G., Sánchez, S. (2002). Detección de actividades biológicas en microorganismos marinos aislados de la plataforma cubana. *Revista Avicennia*. 17:123-130.
89. Ríos, N., Crespo, C., Terrazas, L., Alvarez, M. (2007). Aislamiento de Cepas Anaeróbicas Termófilas Productoras de Celulasas y Hemicelulasas Implicadas en la Producción de Bioetanol Mediante Técnicas de Cultivo y Aislamiento Tradicionales y no Tradicionales. *Biofarbo*. 15(1):43-50.
90. Ríos, N., Terrazas, L., Álvarez, M. (2009). Producción de enzimas exoxilanolíticas por inmovilización de la bacteria extremófila cepa FT3 en alginato de calcio. *Biofarbo*. 17(1):22-29.

91. Casablanca, E., Ríos, N., Álvarez, M., Terrazas, L. (2009). Optimización de las condiciones de cultivo anaeróbico termófilo para aumentar la producción enzimática de xilanasas con cepas bacterianas encapsuladas y libre. *Biofarbo*. 17(2):51-59.
92. Manzi, L., Mayz, J. (2003). Valorando los microorganismos. Obtenida el 12 de Enero del 2013
http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562003000100018&lng=en&nrm=iso&ignore=.html
93. Valbuena, O., Pereira, J., Daza, R., González, F., Hernández, A., Mora, M., Morales, G., Medina, L. (2010). Actividades Sulforeductora y Desulfurizadora por Bacterias Termófilas Aisladas de Lodos Hidrotermales de Las Trincheras, Venezuela. *Interciencias*. 35(6):414-420.
94. Obeidat, M., Khyami-Horani, H., Al-Zoubi A., Otri I. (2012). Isolation, characterization, and hydrolytic activities of *Geobacillus* species from Jordanian hot springs. *African Journal of Biotechnology*, 11(25), 6763-6768.
95. American Public Health Association [APHA]. (1992). *Métodos Normalizados para el Análisis de Aguas Potables y Residuales American Water*. (Undécima Ed). México: Interoamericana. pp 480-502.
96. MacFaddin, J. (2003). *Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica*. (3ª Ed). Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana. pp 334-396.
97. Cowan, S., Stell, K. (1979). *Manual Para la Identificación de Bacterias de Importancia Médica*. México. Continental. pp 42-69.
98. Ramirez, A., Garcia, E., Longa, A., Sánchez, K., Nieves, M., Velasco, J., Araque, M., Mosquera, N. (2006). *Manual Práctico de Bacteriología General*. Venezuela: Universidad de Los Andes Vicerrectorado académico. pp 79-135.
99. Díaz, L., Montijo, S., Medina, A., Meléndez, P., Laurence, V., Marti-Mestres, G. (2011). Activity of ethanolic extracts leaves of *Machaerium floribundum* against acne-inducing bacteria, and their cytoprotective and antioxidant effects on fibroblast. *Rev. Peru. Biol.* 18(2):153-158.

100. Garassini, L. (1962). El suelo y su microflora. *Rev. Fac. Agrom.* 4 : 202-206.
101. Ramasamy, K., Meyers, M., Bevers, J., Verachtert, H. (1981). Isolation and Characterization of Cellulolytic in Bacteria from Activated Sludge. *Journal of Applied Bacteriology.* 51:475-48.
102. Daniele, A., Amaíz, L., Medina, L., Valbuena, O. (2011). Actividad lipolítica de *Geobacillus stearothermophilus* cepa LN, aislada de las aguas termales de las trencheras, Estado Carabobo, Venezuela. *Ciencia.* 19(3):173-180.
103. Clavell, L.; Pedrique de Aulacio, M. (1992). Análisis microbiológicos de antibióticos. (2ª Ed). Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela. pp 5-34.
104. De la Rosa, M., Sánchez, M., Rodríguez, C., Mosso, M. (2007). Microbiología del manantial termal del Balneario Puente Viesgo. *An. R. Acad. Nac. Fam.* 73:251-265.
105. De la Rosa, M., Pintado, C., Rodríguez, C., Mosso, M. (2009). Microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario de Alicún de las Torres. *An. R. Acad. Nac. Fam.* 75:763-780.
106. Mosso, M., De la Rosa, M., Díaz, F., Medina, R. (1990). Microbiología de las aguas mineromedicinales de Alange. *An. R. Acad. Nac. Fam.* XVI:28-40.
107. Mosso, M., De la Rosa, M. (2011). Microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario de los baños de La Concepción. *An. R. Acad. Nac. Fam.* 77:57-73.
108. Antranikian, G., Vorgias, C., Bertoldo, C. (2005). Extreme Environments as a Resource for Microorganisms and Novel Biocatalysts. *Adv Biochem Engin/Biotechnol.* 96:219–262
109. Mosso, M., Sánchez, M., De la Rosa, M. (2002). Microbiología del Agua Mineromedicinal de Alhama Granada. *An. R. Acad. Nac. Fam.* 26:46-76.
110. De la Rosa, M., Mosso, M., Vivar, M., Medina, M, Arrollo, G., Díaz, F. (1993). Microbiología del Agua Mineromedicinal del balneario de la Toja. *An. R. Acad. Nac. Fam.* XIX: 45-58.

111. Mosso, M., De la Rosa, M., Vivar, C., Medina, M. (1994). Heterotrophic bacterial populations in the mineral waters of thermal springs in Spain. *Journal of Applied Bacteriology*. 77:370-381.
112. Zanetti, F., De Luca, G., Stampi, S. (2000). Recovery of *Burkholderia pseudomallei* and *B. cepacia* from drinking water, *International Journal of Food Microbiology*. 59:67-72.
113. De la Rosa, M., Mosso, M., Prieto, M., Ullán, C. (1999). Microbiología del Manantial Mineromedicinal de Carratraca. *Anal. Real. Acad. Farm.* 65:439-456
114. Limmathurotsakul, D., Wuthiekanun, V., Amornchai, P., Wongsuwan, G., Day N., Peacockb, S. (2011) Effectiveness of a Simplified Method for Isolation of *Burkholderia pseudomallei* from Soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 78(3):876-877.
115. Ramette, A., LiPuma J., Tiedje, J. (2005). Species Abundance and Diversity of *Burkholderia cepacia* Complex in the Environment. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(3):1193-1201.
116. Dance, D. (2000). Ecology of *Burkholderia pseudomallei* and the interactions between environmental *Burkholderia* spp. And human-animal hosts. *Acta Tropica*. 74:159-168.
117. Mosso, M., De la Rosa, M., Diaz, J., Iriarte, G. (1981) Microbiología del Agua de Carabaña. *An. R. Acad. Nac. Fam.* VIII:19-26.
118. Hossain, M., Anawar, M. (2009) *The Chittagong Univ. J. B. Sci.* 4(1-2):107-117.
119. Manaia, C., Nunes, O., Morais, P., Da Costa, M. (1990). Heterotrophic plate counts and the isolation of bacteria from mineral waters on selective and enrichment media. *Journal of Applied Bacteriology*. 69:871-876.
120. Chou, J., Sheu, S., Lin, K., Chen, W., Arun, A., Young, C. (2007). *Comamonas odontotermitis* sp. nov., isolated from the gut of the termite *Odontotermes formosanus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 57:887-891.

121. Kim, K., Ten, L., Liu, Q., Im, W., Lee, S. (2008). *Comomamonas granulli* sp. Nov., Isolated from Granulles Used in a Wasterwater Treatment Plant. *The Journal of Microbiology*. 46(4):390-395.
122. Lee, S., Lee, S. (2001). Isolation and characteriterization of thermotolerant bacterium *Ralstonia* sp. Strain PHS1 that degrades benzene, toluene, ethylbenzene, and o- xylene. *Appl Microbiol Biotechnol*. 56: 270-275.
123. Gómez, E., Alvarez, E., Llano, G. (2005). Identificación y caracterización de cepas de *Ralstonia solanacearum* raza 2, agente causante del Moko de platano en Colombia. *Fitopatologia Colombiana*. 28(2):71-75.
124. Kerr, J. (2006). Bacteria Help Grow Gold Nuggets From Dirt. *SCIENCE*. 313 (14):159.
125. Hayward, A. (1991). Biology and Epidemiology of Bacterial Wilt Caused by *Pseudomonas Solanacearum*. *Annu. Rev. Phytopathol*. 29:65-87.
126. Toffin, L., Bidault, A., Pignet, P., Tindall, B., Slobodkin, A., Kato, C., Prieur, D. (2005) *Shewanella profunda* sp. nov., isolated from deep marine sediment of the Nankai Trough. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 54:1943–1949.
127. Miyazaki, M., Nogi, Y., Usami, R., Horikoshi, K. (2006). *Shewanella surugensis* sp. nov., *Shewanella kaireitica* sp. nov. and *Shewanella abyssii* sp. nov., isolated from deep-sea sediments of Suruga Bay, Japan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 56:1607–1613.
128. Gao, H., Obraztova, A., Stewart, N., Popa, R., Fredrickson, J., Tiedje, J., Neilson, K., Zhou, J. (2006). *Shewanella loihica* sp. nov., isolated from iron-rich microbial mats in the Pacific Ocean. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 56:1911–1916.
129. De la Rosa, M., Díaz, F., Mosso, M. Sánchez, M., (2002). Microbiología de las Agua Mineromedicinal de Fuente Amarga. *An. R. Acad. Nac. Fam*. XI:17-24.

130. Vendrell, M., Sinde, E., Torres, M., Gil, P., Rodríguez, L. (1998). Estudio de Microorganismos Patógenos en la Fuente termal de O Tinteiro en Ourense. *Cienc. Tecnol. Aliment.* 2(2):92-95.
131. Cunha B. (2010). *Infections Disease and Therapy Series*. (3ª Ed.) New York . Informa Healthcare. pp 12-33.
132. Mosso, M., Sánchez, M., Rodríguez, C., De la Rosa, M. (2006). Microbiología de las aguas mineromedicinales del Balneario Cervantes. *An. R. Acad. Nac. Fam.* 72:285-304.
133. Doit, C., Loukil, C., Simon, M., Ferroni, A., Fontan, J., Bonacorsi, S., Bidet, P., Jarlier V., Aujard, Y., Beauflis, F., Bingen, E. (2004). Outbreak of *Burkholderia cepacia* Bacteremia in a Pediatric Hospital Due to Contamination of Lipid Emulsion Stoppers. *Journal of Clinical Microbiology.* 42(5):2227–2230
134. Bischofberger, T., Cha, S., Schmitt, R., König, B., Schmidt-Lorenz, W. (1990). The bacterial flora of non-carbonated, natural mineral water from the springs to reservoir and glass and plastic bottles. *International Journal of Food Microbiology.* 11:51-72.
135. Jayasekara, N., Heard, G., Cox, J., Fleet, G. (1998). Populations of pseudomonads and related bacteria associated with bottled non-carbonated mineral water. *Food Microbiology.* 15:167–176.
136. Guyard, S., Mary, P., Defives, C., Homez J. (1999). Enumeration and characterization of bacteria in mineral water by improved direct viable count method. *Journal of applied microbiology.* 86:841-850.
137. De la Rosa, M., Pintado, C., Rodríguez, C., Mosso, M. (2013). Análisis microbiológico de las aguas de El Raposo. *An. R. Acad. Nac. Fam.* XXXII:65-85.
138. Zhang, S., Moyne, A., Reddy, M., Kloepper, J. (2002). The role of salicylic acid in induced systemic resistance elicited by plant growth-promoting rhizobacteria against blue mold of tobacco. *Biological Control.* 25:288–296.

139. Hsueh, P., Teng, L., Pan, H., Chen, Y., Sun, C., Ho, S., Luh, K. (1998). Outbreak of *Pseudomonas fluorescens* Bacteremia among Oncology Patients. *Journal Of Clinical Microbiology*. 36(10):2914–2917.
140. Wong, V., Levi, K., Baddal, B., Turton, J., Boswel, T. (2011). Spread of *Pseudomonas fluorescens* Due to Contaminated Drinking Water in a Bone Marrow Transplant Unit. *Journal of Clinical Microbiology*. 49(6):2093–2096.
141. Mosso, M., Diaz, F., De la Rosa M. (1986). Microbiología de las aguas mineromedicinales de Archena, *An. R. Acad. Nac. Fam.* XII:23-32.
142. Rivas, p. (2011). Detección de biopelículas y agregaciones bacterianas en bacilos Gram negativos no fermentadores Presentes en Sedimentos de Aguas Termales. Cariaco, Municipio Ribero, estado Sucre. Trabajo de grado. Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente, Cumaná.
143. Rondón, E., Villafranca, K. (2012). Microbiota Bacteriana Heterótrofa Viable Cultivable de las Aguas del Sector Aguas Calientes de Tabay del estado Mérida. Trabajo de grado. Departamento de Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Facultad de Farmacia y Bioanálisis.
144. Doménech. S., Olea, F., Berocal, C. (2008). Infecciones relacionadas con aguas de recreo. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 26(13):32-7.
145. Quevedo-Sarmiento, J., Ramos-Crmenzana A., Gozalez-Lopez, J. (1986). Isolation and characterization of aerobic heterotrophic bacteria from natural spring waters the Lanjaron area (Spain). *Journal of Applied Bacteriology*. 61:365-372.
146. Guillot E., H. Leclerc, H. (1993). Biological specificity of bottled natural mineral waters: characterization by ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns. *Journal of Applied Bacteriology*. 75:292-298.
147. Lalucat, J., Bennasar, A., Bosch, R., García-Valdés, E., Palleroni, N. (2006). Biology of *Pseudomonas stutzeri*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 70(2):510–547.
148. De la Rosa, M., Mosso, M., Días, F., Vivar, M., Medina, M. (1991). Microbiología de Los Manantiales de Aguas Mineromedicinales de Fitero. *An. R. Acad. Nac. Fam.* XVIII:44-60.

149. Mavridou, A. (1992). Study of the bacterial flora of a non-carbonated natural mineral water. *Journal of Applied Bacteriology*. 73:355-361.
150. Pandey, S., Narayan, K., Bandyopadhyay, S., Nayak, K., Das, S. (2009). Thiosulfate Oxidation by *Comamonas* sp. S23 Isolated from a Sulfur Spring. *Curr. Microbiol.* 58:516–521.
151. Kulakov, L., McAlister, B., Ogden, K., Larkin, M., O'Hanlon, J. (2002). Analysis of Bacteria Contaminating Ultrapure Water. *Industrial Systems. Applied and Environmental Microbiology*. 68(4):1548–1555.
152. Ryan, M., Pembroke, J., Adley, C. (2011). Genotypic and phenotypic diversity of *Ralstonia pickettii* and *Ralstonia insidiosa* isolates from clinical and environmental sources including High-purity Water. Diversity in *Ralstonia pickettii*. *BMC Microbiology*. 11:194-205.
153. Coneye, T., Goris, J., De vos, P., Vandammen, P, LiPuma, J. (2003). Classification of *Ralstonia pickettii* – Like isolates from the environment and clinical samples as *Ralstonia insidiosa* sp. Nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 53:1075-1080.
154. Pan, W., Zhao, z., Dong. (2011). Lobar pneumonia caused by *Ralstonia picketti* in a sixty-five-year-old han a Chinese man. *Journal of Medical Case Reports*. 5: 1-4.
155. Ryan, M., Pembroke, J., Adley, C. (2006). *Ralstonia pickettii*: a persistent Gram-negative nosocomial infectious organism. *Journal of Hospital Infection*. 62:278–284.
156. Nealson, K., Myers, C., Wimpee, B. (1991). Isolation and identification of manganese-reducing bacteria and estimates of microbial Mn(IV)-reducing potential in the Black Sea. *Deep-Sea Research*. 38(2):5907-5920.
157. Jacovides, C., Moser, D. (2007) Universidad de Nevada, *Shewanella* abundance and microbial diversity in springs of Death Valley National Park. Obtenido el 30 de diciembre de 2013 de <http://faculty.unlv.edu/microeu/posters/2007/Jacovides.pdf>.

158. Pucci, G., Acuña, A., Llanes, M., Tiedemann, M., Pucci, O. (2009). Identificación de bacterias marinas cultivables de la ciudad costera Comodoro Rivadavia, Argentina. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. 44(1):49-58.
159. Venkateswaran', K., Moser, D., Dollhopf, M., Lies, D., Saffarini, D., MacGregor, B., B. Ringelberg, D., White, D., Nishijima, M., Sano, H., Burghardt, J., Stackebrand, E., Nealson, K. (1999). Polyphasic taxonomy of genus *Shewanella* and description *Shewanella oneidensis* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 49:705-724.
160. Holt, H., Gahrn-Hansen, B., Bruun, B. (2005). *Shewanella algae* and *Shewanella putrefaciens*: clinical and microbiological. *Clinical Microbiology and Infection*. 11(5):347-352.
161. Coenye, T., Spilker, T., Van Schoor, A., Lipuma, J., Vandamme, P. (2004). Recovery of *Burkholderia cepacia* strain PHDC from cystic fibrosis patients in Europe. *Thorax*. 59:952-954.
162. Mahenthiralingam, E., Baldwin, A., Dowson, C. (2008). *Burkholderia cepacia* complex bacteria: opportunistic pathogens with important natural biology. *J. Appl. Microbiol.* 104:1539-1551.
163. O'Sullivan, LA., Weightman, A., Jones, T., Marchbank, A., Tiedje, J., Mahenthiralingam, E. (2007). Identifying the genetic basis of ecologically and biotechnologically useful functions of the bacterium *Burkholderia vietnamiensis*. *Environ Microbiol.* 9:1017-1034.
164. Parke, JL., Guirán-Sherman, D. (2001). Diversity of the *Burkholderia cepacia* complex and implications for risk assessment of biological control strains. *Annu. Rev. Phytopathol.* 39:225-258.
165. El-Banna, N., Winkelmann, G. (1998). Pyrrolnitrin from *Burkholderia cepacia*: antibiotic activity against fungi and novel activities against Streptomycetes. *J. Appl. Microbiol.* 1998; 85:69-78.
166. Abe, M., Nakasawa, T. (1993). Characterization of hemolytic and antifungal substance, cepalydin, from *Pseudomonas cepacia*. *Microbiol. Immunol.* 38:1-9.

167. Li, X., Quan, C., Yu, H., Fan, S. (2008). Multiple effects of a novel compound from *Burkholderia cepacia* against *Candida albicans*. *Microbiol. Lett.* 285:260-256.
168. Elshafie, H., Camele, I., Racioppi, R., Scrano, L., Iacobellis, N., Bufo, S. (2012). In Vitro Antifungal Activity of *Burkholderia gladioli* pv. *agaricicola* against Some Phytopathogenic Fungi. *Int. J. Mol. Sci.* 13:1629-1632.
169. Araque, Y., Albarado, L., Centeno, S., Rodriguez, L., Flores, V. (2007). Actividad antibiótico y antifúngica de *B. cepacia* provenientes de ambientes nosocomiales. Servicio Autónomo Hospital Universitario "Antonio Patricio Alcalá". Cumaná, Venezuela. *Kasmera*. 35(2):107-117.
170. Parra, E., Centeno, S., Araque, Y. (2009). Actividad antifúngica de *Burkholderia cepacia* aislada de maíz amarillo (*Zea mays* L.) bajo diferentes condiciones de cultivo. Trabajo de grado. Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente, Cumaná.
171. Salles, J., Souza, F., Elsas, Van. (2002). Molecular method to assess the diversity of *Burkholderia* species in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:1595-1603.
172. Bevivino, A., Sarrocco, S., Dalmastri, C., Tabachioni, S., Cantale, C., Chiarini, L. (1998). Characterization of a free-living maize-rhizosphere population of *Burkholderia cepacia*: Effect of seed treatment on disease suppression and growth promotion of maize. *FEMS. Microbiol.* 27: 225-237.
173. Pirone, L. (2005). Detection of cultured and uncultured *Burkholderia cepacia* complex bacteria naturally occurring in the maize rhizosphere. *Environ Microbiol.* 7: 1734-1742.
174. Barrios, J. (2010). Antagonismo de sustancias extracelulares de aislados de *Pseudomonas* sp. provenientes de la cuenca del río Manzanares. Trabajo de grado. Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente, Cumaná.
175. Morales, Y. (2009). Actividad antagónica de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de coprocultivos de niños menores de 5 años. Trabajo de grado. Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente, Cumaná.

176. Thomashow, L. (1996). Biological control of plant root pathogens. *Environmental biotechnology*. 7:343-347.
177. Kloepper, J., Leong, J., Teintze, M., Schroth, M. (1980). *Pseudomonas* siderophores: a mechanism explaining disease-suppressive soils. *Current Microbiology*. 4:317-320.
178. Paulitz, T., Loper, J. (1991). Lack of a role for *fluorescent* siderophore production in the biological control of *Pythium* damping-off of cucumber by a strain of *Pseudomonas putida*. *Phytopathology*. 81:930-935.
179. Gaffney, T., Lam, S., Ligon, J., Gates, J., Frazelle, A., Di Maio, J., Hill, S., Goodwin, S., Torkewitz, N., Allshouse, A., Kempf, H. Becker, J. (1994). Global regulation of expression of antifungal factors by a *Pseudomonas fluorescens* biological control strain. *Mol. Plant Microbe. Interact*. 7(4):455-446.
180. Riera, N. (2012). Purificación y caracterización de un metabolito antifúngico producido por *Pseudomonas fluorescens* CFBP2392. Trabajo de grado. Facultad de Ciencias. Universidad de la Republica. Montevideo Uruguay.
181. Mora, J. (2013). Actividad Antifúngica de La Microflora Asociada a Rizósfera de Pimentón (*Capsicum annuum* L.) en Puerto de La Madera, Cumaná, estado Sucre. Trabajo de grado. Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente, Cumaná.
182. Manwar, A., Khandelwal, S., Chaudhari, B., Meyer, J., Chincholkar, S. (2004). Siderophore Production by a Marine *Pseudomonas aeruginosa* and Its Antagonistic Action Against Phytopathogenic Fungi. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 118:243-251.
183. Benincasa M, Abalos A, Oliveira I, Manresa A. (2004). Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. *Antonie van Leeuwenhoek*. 85:1–8.
184. Coenye, T., Mahenthiralingam, E., Henry, D., Lipuma, J., Laevens, S., Gillis, M., Speert, D., Vandamme, P. (2001). *Burkholderia ambifaria* sp. nov., a novel member of the *Burkholderia cepacia* complex including

- biocontrol and cystic fibrosis-related isolates. *Int. J. Syst. Evo.l Microbiol.* 51:1481–1490.
185. Estrada, P., Bustillos, R., Caballero, J. (2001). *Burkholderia*, a genus rich implant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. *App. Environ. Microbiol.* 67:2790-2798.
 186. Arráiz, N. (2001). Quorum sensing y virulencia en *Pseudomonas aeruginosa*. *Kasmera*. 29(1):97-118.
 187. Andreoni V., Gianfreda, L. (2007). Bioremediation and monitoring of aromatic-polluted hábitats. *Appl Microbiol Biotechnol.* 76:287–308.
 188. Rosenberg, F., Hernandez, H. (1989). Antibiotic Resistance of *Pseudomonas* from German Mineral Waters. *Toxicity Assessment: An International Journal.* 4:281-294.
 189. Massa S., Petruccioli M., Fanelli M., Gori, L. (1995). Drug resistant bacteria in non carbonated mineral waters. *Microbiol. Res.* 150:403-408.
 190. Messi, P., Guerieri, E., Bondi, M. (2005). Antibiotic resistance and antibacterial activity in heterotrophic bacteria of mineral water origin. *Science of the Total Environment.* 346:213– 219.
 191. Tirodismo, I., Arvanitidou, M., Dardavessis, T., Bisiklis, A., Alexiou-Daniil, S. (2010). Prevalence and antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from swimming pools in northern Greece. *Eastern Mediterranean Healht Journal.* 16(7):783-787.
 192. Alvarez, A. (2011). Susceptibilidad antimicrobiana a betalactámicos y detección de betalactamasas en bacterias gran negativas no fermentadoras aisladas del río Manzanares. Cumaná, estado Sucre. Trabajo de grado. Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente, Cumaná.
 193. Ullah, A., Durrani, R., Ali, G., Ahmed, S. (2012). Prevalence of antimicrobial resistant *Pseudomonas aeruginosa* in fresh water spring contaminated with domestic sewage *Journal of Biological and Food Science Research.* 1(2): 19-22

Anexo

Material de vidrio

Envases de vidrio.

Cilindro graduado de 250 mL, 500 mL, 1000 mL.

Fiolas de 250 mL, 500 mL

Termómetro.

Equipo de filtración de membrana.

Placas de Petri.

Tubos de ensayo 13x100 cm y 16x150 cm

Material electrónico

pH Metro electrónico marca.

Bomba de vacío.

Microscopio marca Nikon Eclipse, objetivos 40x0,65, 10x0,25, 4x0,10, 100x1,25 oil.

Estufas.

Medios de cultivo

Agares

Agar Plate Count (PC).

Agar nutriente

Agar Brain Heart infusión (BHI).

Agar Bair Parker (BP)

Agar McConkey (MK)

Agar eosina azul de metileno (EAM).

Agar sangre (Sg).

Agar R₂A.

Agar manitol salado (Ms).

Agar cetrinida (C).

Agar Miuller Hinton (MH)

Agar lisina hierro (LIA)

Agar hierro de Kligler (KIA)

Agar Hugh y Leifson (agar oxidación fermentación O/F)

Agar motilidad

Citrato de Simmons

Gelatina

Caldos

Nitratado.

Almidón

Asparagina

Los medios de cultivo utilizados se prepararon a partir de las formas deshidratadas suministradas por las casas comerciales o se mezclaron los constituyentes del medio, de acuerdo a la formula correspondiente. Los medios se constituyeron con agua destilada y posteriormente se esterilizaron en autoclave a 21°C por 15 minutos.

Reactivos

Solución cristal violeta.

Solución lugol.

Solución alcohol-cetona.

Solución safranina.

Reactivo de Kovacs.

Solución α -naftilamina 0,5%

Ácido sulfamílico 0,8%

Solución de Winogradsky

Solucion extracto de tierra

Material biológico

Las cepas controles

Pseudomonas aeruginosa ATCC27853, *Escherichia coli* ATCC25922, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Escherichia coli* ATCC25972, *Staphylococcus aureus* ATCC29213 *Kliformella pneumoniae* ATCC23352 y el hongo filamentoso *Aspergillus niger*.

Anexo fotográfico

Actividad antimicrobiana

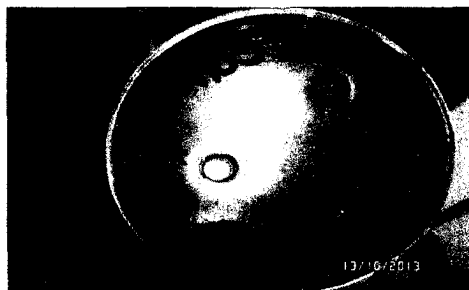


Figura 10. Efecto antagónico *Pseudomonas fluorescens* cepa MA-PC contra *Escherichia coli* ATCC25922.



Figura 11. Efecto antagónico *Pseudomonas aeruginosa* cepa MA-PC/C contra *Escherichia coli* ATCC25922.

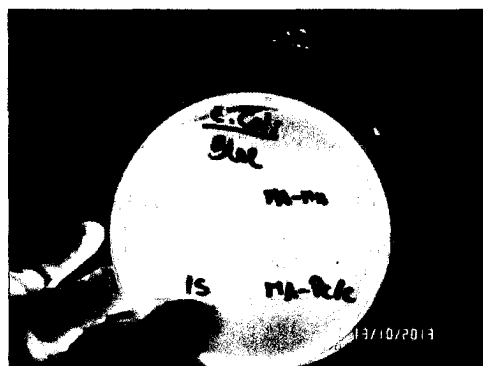


Figura 12. Efecto antagónico *Pseudomonas aeruginosa* cepa MA-PC/C contra *Escherichia coli* ATCC25922.



Figura 13. Efecto antagónico *Pseudomonas fluorescens* cepa MA-PC contra *Staphylococcus aureus* ATCC25923.

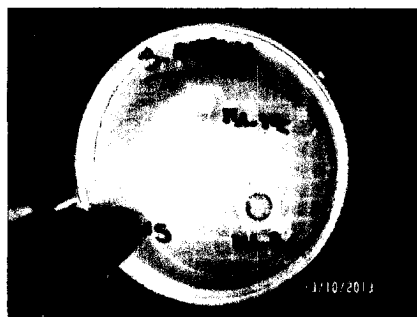


Figura 14. Efecto antagónico *Pseudomonas aeruginosa* cepa MA-PC/C contra *Staphylococcus aureus* ATCC25923

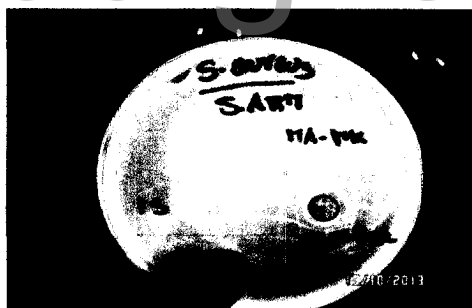


Figura 15. Efecto antagónico *Pseudomonas aeruginosa* cepa MA-PC/C contra *Staphylococcus aureus* ATCC29213.

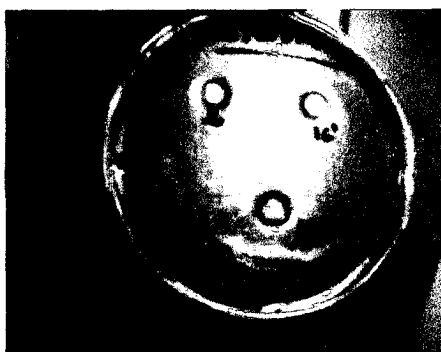


Figura 16. Efecto antagónico *Pseudomonas fluorescens* cepa MA-PC contra *Klebsiella pneumoniae* ATCC23352.

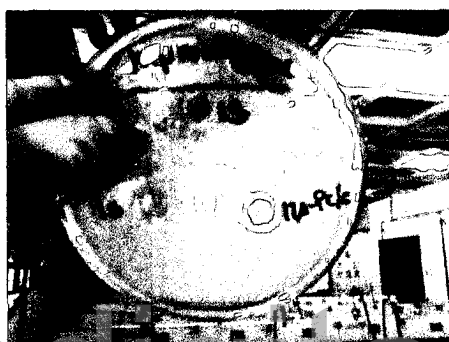


Figura 17. Efecto antagónico *Pseudomonas aeruginosa* cepa MA-PC/C contra *Klebsiella pneumoniae* ATCC2335.