



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
POSTGRADO QUÍMICA DE MEDICAMENTOS
DOCTORADO EN QUÍMICA DE MEDICAMENTOS
OPCION BIOTECNOLOGÍA

**CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA Y POTENCIAL
BIOTECNOLOGICO DE LAS AGUAS TERMALES DE LA MUSUY,
ESTADO MÉRIDA**

www.bdigital.ula.ve

Autora:

Msc. Gutiérrez Cadenas María Gabriela

Tutor:

Prof. Dr. Félix Andueza Leal

Mérida, diciembre de 2019

C.C Reconocimiento

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
POSTGRADO EN QUÍMICA DE MEDICAMENTOS
OPCIÓN BIOTECNOLOGÍA

CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA Y POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE LAS AGUAS TERMALES DE LA MUSUY, ESTADO MÉRIDA

Autor: Gutiérrez María Gabriela

Tutor: Félix Andueza

Diciembre 2019

RESUMEN

Las aguas de manantiales termales emergentes de capas profundas de la tierra, han sido tradicionalmente utilizadas con fines terapéuticos en pozos de origen natural y balnearios construidos con fines recreativos. El contenido de minerales de estas aguas y sus características fisicoquímicas han sido ampliamente descritos. No obstante, los estudios microbiológicos de las aguas termales pudieran revelar la presencia de microorganismos capaces de sobrevivir en condiciones extremas de temperatura y frente a sustancias geoquímicas diversas, mejorando la comprensión de las adaptaciones metabólicas a este tipo de hábitats, la diversidad bacteriana existente, así como la calidad microbiológica de las fuentes termales. El presente estudio tuvo como objetivo determinar la composición de la población bacteriana y la calidad microbiológica del agua de los manantiales termales de La Musuy. A las muestras de agua recolectadas en la naciente y pozo superior se les determinaron los indicadores de calidad sanitaria, bacterias heterótrofas viables cultivables, se identificaron los géneros y especies bacterianas presentes, su resistencia frente a ciertos antimicrobianos y la producción de enzimas. Los resultados obtenidos indican la presencia de coliformes totales entre $2,5 \times 10^1$ a $1,6 \times 10^3$ UFC/mL y coliformes fecales entre $1,5 \times 10^1$ a $2,0 \times 10^2$ UFC/mL. Se identificaron las especies *Brevundimonas vesicularis*, *Burkholderia cepacia*, *Aeromonas hydrophila*, *Alcaligenes denitrificans*, *Aeromonas salmonicida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Weeksella virosa*, *Pseudomonas stutzeri*, *Comamonas tetosteroni*, *Shewanella putrefaciens*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Ralstonia pickettii*. Algunas de las especies demostraron resistencia frente a más de un antibiótico. Se evidenció entre los aislados actividad proteasa, amilolítica y lipolítica. Los resultados obtenidos demuestran que las aguas termales analizadas no son aptas para el consumo humano, por lo que se recomienda adoptar prácticas higiénicas durante su uso para evitar la posible transmisión de enfermedades. Algunas de las especies encontradas poseen actividad proteasa, lipasa y amilasa.

Palabras clave: Aguas termales, actividad biológica, calidad sanitaria, diversidad bacteriana, susceptibilidad antimicrobiana.

ÍNDICE GENERAL

	Pp.
ÍNDICE DE TABLAS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
CAPÍTULO	
I INTRODUCCIÓN	1
Generalidades de las aguas termales	4
Clasificación de las aguas termales	9
Propiedades terapéuticas de las fuentes termales	13
Mecanismos de acción del agua en el organismo	18
Microorganismos de las aguas	21
Influencia de los factores físicos y químicos sobre el crecimiento de los microorganismos de las aguas	22
Metodología para el estudio microbiológico de las aguas	24
Microorganismos de las aguas termales	24
Adaptaciones moleculares de los microorganismos a las altas temperaturas	34
Enzimas de microorganismos aislados de fuentes termales	35
Resistencia antimicrobiana en microorganismos aislados de fuentes termales	42
Análisis microbiológico de las aguas de manantiales minerales termales	46
Calidad sanitaria del agua	54
Fuentes termales del estado Mérida	57
Objetivos de la Investigación	59
Objetivo General	59
Objetivos Específicos	59
II METODOLOGÍA	60
Población y Muestra	60
1. Identificación y selección de los sitios de muestreo	60
1.1 Ubicación geográfica de las aguas termales La Musuy	60
2. Recolección de las muestras	61
2.1 Características geográficas y fisicoquímicas de La Musuy	61
2.2 Toma de las muestras de agua termal	61
3. Determinación de bacterias aerobias heterótrofas viables	63
4. Identificación microbiológica de las bacterias aisladas	66
4.1 Identificación de bacterias heterótrofas viables cultivables	66

4.1.1 Tinción de Gram.....	66
4.1.2 Prueba de oxidasa	68
4.1.3 Prueba de catalasa	68
4.1.4 Prueba del tipo de respiración	69
4.1.5 Prueba de Oxidación - Fermentación de Glucosa	70
4.1.6 Prueba de Motilidad	71
4.2 Identificación de bacilos gramnegativos fermentadores	71
4.2.1 Fermentación de la Lactosa y producción de gas	71
4.2.2 Reacción en Agar Kliger (KIA)	72
4.2.3 Uso del Citrato de Simmons	73
4.2.4 Formación de Indol	75
4.2.5 Reducción de Nitratos	75
4.2.6 Galerías API® 20E	75
4.3 Identificación de bacilos gramnegativos no fermentadores	76
4.3.1 Hidrólisis de esculina	76
4.3.2 Reducción de nitratos	76
4.3.3 Crecimiento a 42°C	77
4.3.4 Galerías API® 20NE	77
5. Aislamiento de bacterias potencialmente patógenas	77
5.1 Aislamiento de <i>Staphylococcus aureus</i>	77
5.2 Aislamiento de <i>Salmonella</i>	79
6. Determinación de indicadores de calidad sanitaria	82
6.1 Coliformes totales y fecales	82
6.2 Determinación y aislamiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	83
6.3 Mohos y Levaduras	84
7. Evaluación del perfil de resistencia antimicrobiana	85
8. Determinación de actividades biológicas	86
8.1 Biodegradación del almidón	86
8.2 Biodegradación de celulosa	88
8.3 Biodegradación de proteínas	89
8.4 Biodegradación de lípidos	90
III RESULTADOS Y DISCUSIÓN	92
1. Características bioclimáticas de la localidad donde se encuentran las aguas termales estudiadas	92
2. Resultados del aislamiento de bacterias heterótrofas viables cultivables	95
3. Resultados de la Identificación de las cepas bacterianas aisladas	103
4. Resultados de indicadores de calidad sanitaria de los manantiales termales	115
5. Resultados de aislamiento de bacterias potencialmente patógenas	115
6. Resultados de los ensayos de resistencia antimicrobiana	119
7. Resultados de las pruebas de actividad biológica	125
IV CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	134
Conclusiones	134

Recomendaciones
REFERENCIAS

137
138

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Pp.
1	Clasificación de las aguas termales según su temperatura	10
2	Clasificación de las aguas termales según su composición química	11
3	Clasificación de las aguas termales para consumo según su composición mineral	12
4	Clasificación de las aguas termales según su presión osmótica	12
5	Clasificación de las aguas termales según su mineralización	13
6	Propiedades terapéuticas de las aguas termales según su composición mineral	17
7	Clasificación de las bacterias de acuerdo a sus requerimientos de temperatura	23
8	Límites de temperatura para el crecimiento de seres vivos	27
9	Principales enfermedades bacterianas transmitidas por el consumo de agua	56
10	Fechas en las que se realizaron los muestreos de aguas termales La Musuy durante el período 2016-2017	63
11	Composición del agar PlateCount	64
12	Composición del agar R2A	64
13	Composición del agar BHI	66
14	Composición del agar TSA	67
15	Composición del medio fluido tioglicolato	69
16	Composición del medio de Hugh-Leifson	70
17	Composición del caldo lactosado	72
18	Composición del agar Kliger	73
19	Composición del agar citrato de Simmons	74
20	Composición del caldo caseína de Soya	78
21	Composición del agar Baird Parker	78
22	Composición del caldo Selenito	79
23	Composición del caldo Tetrionato (MuellerKauffman)	80
24	Composición del Agar Salmonella-Shigella	80
25	Composición del agar Bismuto-Sulfito	81
26	Composición del agar verde brillante Rojo Fenol	82
27	Composición del agar Eosina Azul de Metileno	83
28	Composición del agar Cetrimida	84
29	Composición del agar Saboraud Dextrosa	85
30	Composición del agar MuellerHinton	86
31	Composición del medio para microorganismos amilolíticos	87
32	Composición de la solución salina de Winogradsky	87

33	Composición de la solución yodo-yodurada	88
34	Composición del medio con celulosa	89
35	Composición del medio gelatina	90
36	Composición del medio agar Tributirina	91
37	Descripción geográfica y bioclimática de los manantiales termales La Musuy	92
38	Características de la vegetación y del agua termal La Musuy	93
39	Recuento de bacterias heterótrofas viables (UFC/mL) en muestras de aguas termales La Musuy incubadas a temperatura ambiente	96
40	Recuento de bacterias heterótrofas viables (UFC/mL) en muestras de aguas termales La Musuy incubadas a 37°C	99
41	Número de cepas de bacterias heterótrofas aisladas en los muestreos de las fuentes termales La Musuy	103
42	Resultados de las Pruebas bioquímicas preliminares realizadas a las cepas aisladas de la fuente termal La Musuy	106
43	Resultados de la identificación de las cepas aisladas utilizando las galerías API 20E [®]	109
44	Resultados de la identificación de las cepas aisladas de las fuentes termales utilizando las galerías API 20NE [®]	110
45	Identificación de Géneros y Especies aisladas de los manantiales termales La Musuy	111
46	Especies identificadas en las fuentes termales La Musuy a lo largo de los muestreos	116
47	Valor promedio anual de indicadores de calidad sanitaria obtenido para los manantiales termales de La Musuy	117
48	Resultados de los ensayos de resistencia/susceptibilidad frente a agentes antimicrobianos	121
49	Recuento de microorganismos amilolíticos aislados de las fuentes termales La Musuy (NMP/100 mL) durante los muestreos	127
50	Recuento de microorganismos proteolíticos aislados de las fuentes termales La Musuy (NMP/100 mL) durante los muestreos	130

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Pp.
1	Esquema de formación de los manantiales termales	4
2	Microfotografía electrónica de <i>Thermusaquaticus</i>	26
3	Mapa geológico de la distribución de aguas termales en el estado Mérida	58
4	Recuento de heterótrofos viables incubados a temperatura ambiente por fecha de muestreo en las aguas termales	98
5	Recuento de heterótrofos viables incubados a temperatura de 37°C por fecha de muestreo en las aguas termales	100
6	Distribución porcentual de cepas de bacterias heterótrofas durante los muestreos realizados entre el 2016-2017	104
7	Distribución porcentual de cepas de bacilos gramnegativos fermentadores y no fermentadores aislados de las fuentes termales La Musuy	108
8	Distribución porcentual de especies con actividad biológica aisladas de las fuentes termales La Musuy	132

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

El agua es el medio predominante sobre la tierra, del contenido total de agua del planeta, aproximadamente el 97% se encuentra en los océanos, el 2% se encuentra en los glaciares y en los hielos polares, por debajo del 0,1% se encuentra en los lagos y el resto en las aguas subterráneas. El hecho de que los océanos ocupan casi las tres cuartas partes de la tierra, hace inferir en la influencia de este elemento natural en el desarrollo de la diversidad biológica que conocemos hoy en día.

En este sentido, el agua no solamente es fundamental para la existencia de los seres vivos macroscópicos, tales como las plantas y los animales, sino también para aquellos seres microscópicos que habitan en ella, tales como bacterias, arqueas, hongos, levaduras y virus entre otros. Particularmente, los manantiales de aguas termales poseen características fisicoquímicas que determinan la presencia de poblaciones autóctonas de microorganismos particulares (Cabral, 2010).

Las aguas termales se distinguen por su alta temperatura y su concentración de iones tales como sulfatos, carbonatos, bicarbonatos entre otros, los cuales seleccionan la existencia de especies microbianas capaces de sobrevivir bajo condiciones extremas de desarrollo. Estas características hacen de las aguas termales una fuente de microorganismos con posibles aplicaciones biotecnológicas de interés para las industrias manufactureras, farmacéuticas e inclusive en la biorremediación de compuestos perjudiciales para el medio ambiente (Clardy y col., 2006; Bredholt y col., 2007; Viviano y col., 2010)

Adicionalmente, las aguas termales han sido ampliamente utilizadas para tratar múltiples dolencias, entre las que se incluyen la artritis reumatoide, cansancio muscular, gota, trastornos circulatorios, respiratorios y otras afecciones (Trabelsi y col., 2016). En países del continente europeo, entre ellos España, Francia y Portugal, existe una cultura de uso y preservación de las fuentes de aguas termales con fines curativos, resultando con una gran afluencia de usuarios, especialmente los pacientes inmunocomprometidos, por lo que resulta de gran importancia garantizar la calidad microbiológica de este tipo de aguas con el fin de evitar la transmisión de enfermedades (De la Rosa y Mosso, 2000).

Diversos autores han identificado en manantiales termales bacterias heterótrofas aerobias gramnegativas, entre las que se incluyen *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas stutzeri*, *Brevundimonas* spp., *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Ralstonia pickettii*, *Comamonas* spp., *Sphingomonas paucimobilis*, *Acinetobacter* spp., y *Alcaligenes* spp. En estos hábitats se encuentran con menor frecuencia bacterias grampositivas, sin embargo, se pueden encontrar cocos grampositivos y algunos patógenos oportunistas para el ser humano (De la Rosa y Mosso, 2000; Kanokratana y col., 2004; Perevalova y col., 2008; Souza y col., 2006).

En Latinoamérica, específicamente en Argentina, Colombia, México, Perú y Venezuela, se han realizado estudios para conocer la microbiota de aguas termales regionales y establecer indicadores de calidad sanitaria de estos ecosistemas, igualmente se han estudiado las potencialidades biotecnológicas de los microorganismos presentes incluso se han sugerido medidas de protección para la conservación de los acuíferos (Andueza, 2007). Particularmente en Venezuela, el tema ha sido escasamente abordado, y la mayoría de las referencias existentes refieren únicamente los aspectos geológicos, fisicoquímicos y

medioambientales de las aguas (Burguera y col., 1983; Urbani, 1991, Urbani y col., 2004; Dugarte, 2015).

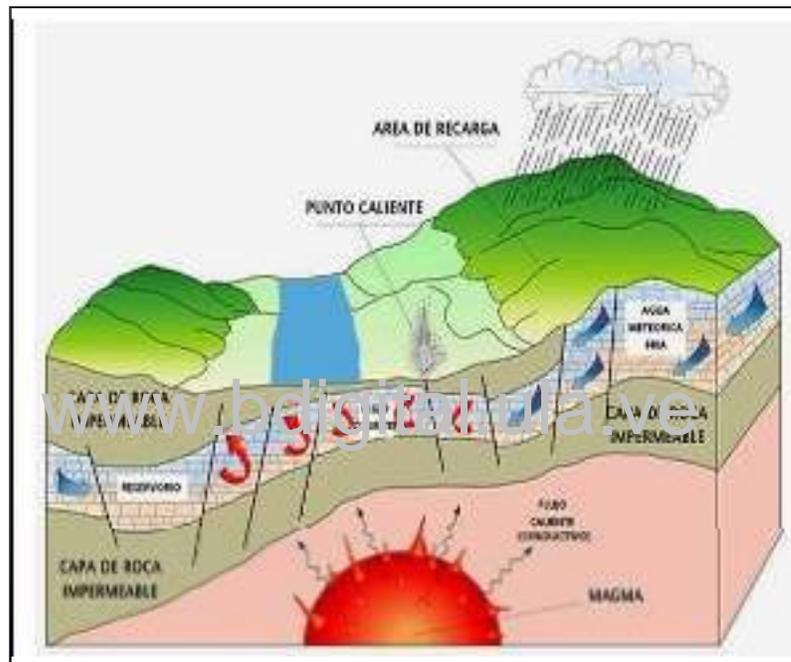
En Venezuela, para el año 1970 se habían reportado cerca de cincuenta localidades con fuentes de aguas termales entre la región central, occidental y el oriente venezolano. Estas fuentes de agua, en su mayoría son actualmente explotadas con fines recreativos y se presentan en distintas formas: manantiales de agua caliente, hervideros de lodo, emanaciones de vapor de agua, de gases sulfurados entre otras, cuya característica en común son las temperaturas notablemente elevadas, encontrándose en promedio entre 5-6°C por encima de las temperaturas medias locales.

Mérida constituye uno de los estados con mayor cantidad de aguas termales, las cuales se encuentran distribuidas en tres fajas: una al Norte (zona deprimida), representada por Caño Zancudo, Santa Apolonia, Bocadillos, Zea, Las Dantes y Piñango, otra en la zona Central, conformada por las fuentes de Mucuchíes, Tabay, La Culata, El Chama, Ejido, Quebrada sucia, Jají y Chiguará y la zona Sur, en el frente de la depresión Andina con el estado Barinas, en donde se encuentran las fuentes de Bailadores, Canaguá y Santa María de Caparo (Burguera y col., 1980).

Debido a la gran riqueza hidrológica del estado Mérida y a la importancia de las aguas termales desde el punto de vista de su biodiversidad y como posibles reservorios de metabolitos microbianos de interés industrial, en el presente trabajo de investigación se analizó el perfil bacteriano de las aguas termales de la Musuy, en el municipio Rangel del estado Mérida, su calidad sanitaria y la posible actividad biológica de las especies presentes en dichos manantiales. Cabe mencionar que la revisión realizada en este trabajo contempla bibliografía del tema desde los estudios pioneros en fuentes termales del estado Mérida realizados hace dos últimas décadas hasta la actualidad.

GENERALIDADES DE LAS AGUAS TERMALES

Las fuentes de aguas termales son drenajes naturales de aguas subterráneas hacia la superficie de la tierra, cuya temperatura en el área del brote es apreciablemente mayor a la temperatura atmosférica, encontrándose en promedio 5-6°C por encima de la temperatura ambiental (Figura 1).



Fuente: Mukherjee y col., (2012)

Figura 1. Esquema de formación de los manantiales termales

Hacia finales del siglo XIX se consideraba que las aguas termales eran de origen volcánico, sin embargo, los estudios posteriores revelaron que casi todas las aguas subterráneas proceden de aguas meteóricas, lluvia o nieve, infiltradas desde la superficie del terreno y, en menor proporción, de la infiltración de aguas fluviales o lacustres. Existen una serie de factores que condicionan la existencia de las infiltraciones de agua en el subsuelo, tales como: abundancia de precipitaciones, porosidad de las rocas superficiales,

Pendiente del terreno (mientras más pronunciada sea la pendiente más corre el agua y menos se filtra) y densidad de la cubierta vegetal.

Las aguas subterráneas se originan como resultado de las precipitaciones atmosféricas que caen sobre la superficie terrestre y se filtran a través de las porosidades del suelo, quedando retenidas sobre las capas impermeables del mismo. Su origen también puede atribuirse a la filtración marginal de las aguas de ríos y lagos aledaños a la formación. El estrato del suelo que conduce el agua subterránea, se denomina capa acuífera y el que se encuentra debajo y es impermeable, se denomina capa de retención. El nivel de agua subterránea está sujeto a variaciones estacionales debido a la marcada influencia de las precipitaciones (Grant, 1989; Ortega, 2015).

Tradicionalmente, se clasifica a las aguas termales según su origen geológico en tres categorías (Ortega, 2015):

Aguas Superficiales o de infiltración: Son aquellas aguas que brotan de fallas sin relación con rocas eruptivas. El caudal que varía con la lluvia y las estaciones, está en relación inversa con la mineralización. No suelen contener elementos característicos de las emanaciones metálicas de las profundidades (boro, arsénico, bromo, flúor, cobre) y su temperatura varía por debajo de los 30°C.

Aguas profundas, magmáticas o primitivas: Son aquellas aguas que brotan de fallas relacionadas con filones metálicos (acumulación de minerales) o eruptivos. Tienen un caudal y una composición química constante, encontrándose en estado libre elementos propios de las emanaciones. Frecuentemente son aguas radiactivas. La temperatura es constante y suele ser elevada.

Aguas de origen mixto: son aquellas aguas que resultan de la mezcla de aguas meteóricas de infiltración reciente con aguas profundas.

En general, el agua subterránea es pobre en nutrientes como resultado del proceso de filtración que experimenta a través de las distintas

capas del suelo, lo que a su vez origina un escaso contenido bacteriano. Dicha agua infiltrada desciende por gravedad, hasta que su curso se detiene por la presencia de alguna capa impermeable, capaz de retenerla, quedando de esta manera almacenada, lo que conduce a la saturación del terreno, con la consecuente formación de un acuífero o napa (capa del suelo que contiene agua). En los sitios en los que un acuífero es cortado por la superficie del terreno, se produce un escape natural del agua, constituyendo un manantial. El agua de los manantiales lleva disueltas diversas sales extraídas de los terrenos por los que circulan (Rheinheimer, 1987).

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 por las que transita. Debido al paso de agua fría y en algunos casos por el 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 descenso, en este proceso el agua encuentra escapatorias por las aberturas donde emerge a la superficie produciendo un escape natural de agua, originando de esta manera el manantial termal (Duque, 2003).

Las aguas provenientes de napas profundas o de zonas donde hay vestigios de actividad volcánica, brotan en la superficie con temperatura superior a la atmosférica, denominándose fuentes termales. Particularmente en el estado Mérida, los manantiales hidrotermales no provienen de actividad volcánica ya que no existen formaciones de este tipo en la entidad, sino que su origen es meteórico (Rheinheimer, 1987).

Las aguas que se infiltran en la corteza, por la acción del gradiente geotérmico desencadenan el escurrimiento y precipitación de minerales hasta encontrar escapatoria por aberturas o fallas por donde afloran a la superficie. La temperatura de las aguas entre 1-2 Km de profundidad es

cercana a los 100°C y durante su trayecto ascendente hacia la superficie se estima que ocurre una pérdida gradual de calor (Burguera y col., 1983).

Por otra parte, desde el punto de vista medicinal, el origen de las aguas termales se remonta a las civilizaciones primitivas, que consideraban que los dioses eran los que distribuían “la salud y la enfermedad”, de manera que, para los griegos, Hércules era la divinidad que ejercía mayor influencia en la acción curativa de las aguas. En este contexto, la mayor parte de los centros médicos disponían de manantiales que facilitaban las prácticas hidroterápicas, llegando a constituir verdaderas escuelas de médicos favorecidas por la concentración de enfermos (Monasterio, 2008).

Posteriormente, Hipócrates se ocupa del uso de las aguas en el tratamiento de muy diversas afecciones, y si bien los sacerdotes de los templos ejecutaban prácticas termales, su obra “De los aires, aguas y lugares”, pone de relieve el interés del empleo de las aguas como medio natural, para ayudar al organismo a recuperar la salud. En Roma, según Plinio, durante 600 años las prácticas hidroterápicas con aguas minerales fueron remedio soberano, encontrándose evidencias de magníficas instalaciones para efectuar la práctica del termalismo. Galeno y Herodoto llegaron a puntualizar principios básicos de estas curas en obras como “Tratado de los agentes de la medicina externa”.

Años más tarde, la dominación de los bárbaros supuso la destrucción de un gran número de termas romanas y un paso atrás en el desarrollo de las curas hidrotermales. Seguidamente, las cruzadas dieron paso a un nuevo florecimiento de las curas termales, al utilizarse los tratamientos con aguas minerales para facilitar la recuperación de los heridos y combatir las enfermedades contraídas en Oriente (Porter, 1990; Lamoreaux y col., 2001; Ortega, 2015).

En América, cinco siglos antes de Jesucristo, los mayas utilizaban aguas termales como agentes terapéuticos, tribus como los Sioux, Creddks, Chippewas recurrían a las aguas termales como agentes terapéuticos y los

baños de vapor seguidos de aplicaciones de agua fría, eran considerados excelentes medios para robustecer la salud y sanar las enfermedades. El agua era considerada un producto natural, con una composición química particular dependiendo del manantial de procedencia y cuya pureza debía ser conservada para que ejerciera un efecto benéfico en particular. Además de esto, se consideraba que el agua debía tener una concentración mínima de minerales para ser considerada como “agua mineral” y en consecuencia atribuírsele un efecto benéfico en la salud de los seres humanos (Porter, 1990; Monasterio, 2008).

Desde el punto de vista biológico, las fuentes de aguas termales son ecosistemas acuáticos cuya composición química y temperatura de emergencia hacen de ellas nichos ecológicos particulares que favorecen el desarrollo de determinadas especies. En este tipo de ecosistemas es frecuente la presencia de comunidades microbianas con diferentes niveles de complejidad según las condiciones ambientales, las cuales pueden formar biopelículas adheridas a superficies o flotar en el agua, inclusive, en fuentes termales con alto contenido de sales, es posible encontrar precipitados de naturaleza biótica llamados estromatolitos, que con el transcurso del tiempo se solidifican en forma de rocas (Andueza, 2006).

Por otra parte, la definición de aguas mineromedicinales fue utilizada por primera vez en España en el año 1697, denominándose así a aquellas aguas que reciben de los minerales alguna cualidad desconocida en aquel momento, y que se utilizaban como medicamento. Posteriormente, en el año de 1805 se desarrolló una definición más completa en el Diccionario de Medicina y Cirugía Española, indicando que las aguas mineromedicinales eran todas aquellas que contienen sustancias extrañas, salinas, azufradas terrosas, metálicas o gaseosas y que ofrecían uno de los medios más sencillos e importantes para prevenir y curar enfermedades.

Terapéuticamente, los hidrólogos consideran que la eficacia de estas aguas depende de su composición especial y características como su

temperatura, ejerciendo una notable influencia en los componentes biológicamente activos, razón por la cual no pueden existir dos o más aguas mineromedicinales idénticas (Armijo y San Martín, 1994; Ortega, 2015).

CLASIFICACIÓN DE LAS AGUAS TERMALES

En general, las aguas termales pueden clasificarse en base a sus características geológicas, composición química y propiedades terapéuticas. Algunas de las clasificaciones mayormente aceptadas son las siguientes:

1. Temperatura:

Una de las características más apreciable de las aguas termales es su temperatura de emergencia, la cual puede asociarse a sus propiedades terapéuticas e influye en la clase de microorganismos que pueden encontrarse en las diferentes fuentes. Las aguas termales debido a su origen subterráneo, suelen mantener la temperatura constante, a excepción de las aguas de capas (porosidad primaria) en las que existen 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 cien metros de profundidad poseerá una temperatura superior en dos o tres grados, a otra que se encuentre en un terreno compacto situado solamente a treinta metros abajo de la superficie, según la ley del gradiente geotérmico (Duque, 2003).

Una de las primeras clasificaciones en base a la temperatura fue propuesta por Ossan en el año 1829, quien agrupaba las aguas acorde a su temperatura de emergencia en: Frías <18°C, Frescas (18-24)°C, Tibias (24-31)°C, Calientes (31-37)°C y Muy calientes (37-100)°C. Posteriormente, en el año 1943, Wollman clasificó las aguas denominadas “con calor natural” en

tibias (20-29)°C, calientes (30-39)°C y muy calientes >40°C (Rheinheimer, 1987; Arias y col., 1995).

Actualmente, la clasificación más aceptada tomando como referencia la temperatura corporal es la que se refleja en la Tabla 1.

Tabla 1.- Clasificación de las aguas termales según su temperatura

Categoría	Temperatura (°C)
Frías	<20
Hipotermas	20 - 29
Mesotermas	30 - 50
Hipertermas	50 - 100

Fuente: Modificado de Arias y col., (1995), Rheinheimer (1987).

2. Composición Química

Las aguas termales poseen en su composición sales disueltas disociadas bajo la forma de iones, sales no disueltas, generalmente carbonatos y sulfatos, vapor de agua, gases libres (gas carbónico, nitrógeno y gas sulfuroso) y en ocasiones sustancias radiactivas. Para que una fuente sea considerada mineral, debe contener al menos un gramo de sustancia mineral por cada litro de agua (1 g/L).

En base a este contenido de minerales, es posible clasificar las aguas tomando en consideración la cantidad mínima requerida de cierto mineral para que sea incluida en una u otra categoría, tal como puede visualizarse en la Tabla 2. Cabe destacar, además, que se consideran aguas alcalinas, aquellas que tienen predominio de sodio y bicarbonato, mientras que las aguas amargas son las que poseen en su composición predominantemente sulfatos, sodio y magnesio (Arias y col., 1995; Andueza, 2006).

Tabla 2.- Clasificación de las aguas termales según su composición química

Tipo de Agua termal	Contenido Mineral	Cantidad (mg)
Aciduladas	Dióxido de Carbono	>250
Arsenicales	Arsénico	>0.2
Estróncicas	Estroncio	>10
Ferruginosas	Hierro	>5
Litínicas	Litio	>1
Boratadas	Ácido metabórico	>4
Bromuradas	Bromuro	>4
Fluoradas	Fluoruro	>2
Yoduradas	Yoduro	>1
Sulfurosas	Sulfuro, Sulfhídrico, Tiosulfato	>2

Fuente: Modificado de Rheinheimer (1987); Arias y col., (1995).

Por otra parte, en España existe una categorización de las aguas termales cuando son indicadas para tratamiento terapéutico por vía oral (Tabla 3), basada en el Real Decreto del 18 de octubre del 2002, el cual regula el proceso de elaboración, circulación y comercio de aguas de bebida envasadas (Andueza, 2006; Ortega, 2015).

Tabla 3.- Clasificación de las aguas termales para consumo según su composición mineral

Tipo de Agua	Sustancia mineral	Concentración (ppm)
Bicarbonatada	Bicarbonato sódico y/o potásico	> 600
Sulfatada	Sulfato de sodio y/o calcio	> 200
Cálcica	Calcio	> 150
Magnésica	Magnesio	> 50
Fluorada	Fluoruros	>1
Ferruginosa	Hierro bivalente	>1
Acidulada	Dióxido de Carbono libre	> 250
Sódica	Sodio	> 200
Cloruradas	Cloruro	> 200

Fuente: Modificado de Andueza (2006).

3. Presión Osmótica:

Las fuentes termales poseen un contenido de sales minerales disueltas que determinan su presión osmótica. La clasificación de las fuentes termales según su presión osmótica expresada en atmósferas (atm) se refleja en la tabla 4.

Tabla 4.- Clasificación de las aguas termales según su presión osmótica

Categoría	Presión osmótica (atm)
Hipotónicas	< 6.5
Isotónicas	6.5
Hipertónicas	>6.5

Fuente: Rheinheimer (1987); Andueza (2006).

4. Mineralización:

Según el contenido de minerales calculado como residuo seco a 110°C, las aguas termales se pueden agrupar en cinco categorías que van desde oligometálicas hasta mineralización fuerte (Tabla 5). En ocasiones se utiliza el término “mineralización marina”, para referirse a aquellas aguas cuyo contenido de minerales es igual o mayor al del agua marina.

Tabla 5.- Clasificación de las aguas termales según su mineralización

Categoría	Minerales (ppm)
Oligometálicas	< 100
Mineralización muy débil	100 - 250
Mineralización débil	250 - 500
Mineralización media	500- 1500
Mineralización fuerte	>1500

Fuente: Modificado de Fheinheimer (1987); Andueza (2006).

PROPIEDADES TERAPÉUTICAS DE LAS FUENTES TERMALES

Las aguas de los manantiales termales han sido reconocidas tradicionalmente por la sabiduría popular como “fuentes sanadoras”, utilizadas tanto de manera interna como externa en el cuerpo humano. La terapia interna, básicamente consiste en la ingesta regular de ciertas cantidades del agua en determinados momentos del día para tratar algunas afecciones del organismo, mientras que la terapia externa se apoya principalmente en hidromasajes, duchas de alta presión y fangoterapia utilizando los lodos termales para tratar dolencias dermatológicas (Burguera y col., 1980; Mian y Mian, 1992; Trabelsi y col., 2016).

El uso de las aguas termales con fines curativos y recreacionales data de los tiempos romanos. Esta tradición continúa hoy en día a través de la

balneoterapia o “terapia spa”, y es recomendada como una medida terapéutica y profiláctica contra muchas enfermedades e intoxicaciones. En muchos lugares alrededor del mundo, tales como España, Japón, Nueva Zelanda, Grecia entre otros, el uso de aguas termales presenta similitudes: los usuarios acuden buscando recuperarse de sus dolencias a través de los baños o inhalación de vapores de las fuentes termales.

Los baños se recomiendan principalmente para el tratamiento de la piel, trastornos articulares, musculares y artritis. La inhalación es recomendada principalmente para enfermedades de las vías respiratorias superiores e inferiores, mientras que la ingesta de agua es recomendada para algunos trastornos en específicos. Los mecanismos mediante los cuales la balneoterapia alivia un amplio espectro de enfermedades aún no se encuentran bien elucidados (Trabelsi y col., 2016).

Dependiendo de la composición del agua y de los elementos minerales presentes en la misma, se suelen atribuir un conjunto de propiedades medicinales en particular, por ejemplo, los baños de aguas saladas y sulfurosas son ampliamente utilizados para el tratamiento de la psoriasis, dermatitis, acné y urticaria. Por otra parte, las aguas cálcicas, bajo la forma de sulfatos o bicarbonatos, ejercen efectos sedantes y atenuadores de la excitabilidad neuromuscular, en especial, las aguas bicarbonatadas favorecen la movilización y eliminación del ácido úrico (Burguera y col., 1980; Lagarto y Bernal, 2002).

Las aguas cloruradas, pueden ser de baja mineralización en caliente o de alta mineralización cuando son frías. Son estimulantes de funciones orgánicas, endocrinas y metabólicas. Cuando se utilizan por vía oral estimulan la secreción y motilidad gástrica e intestinal, facilitando la salida de bilis al intestino; una vez absorbidas activan el metabolismo. Por su mineralización pueden ejercer efectos sobre la piel, estimulando la cicatrización y contribuyendo a la recuperación en las afecciones óseas. Por

vía inhalatoria son favorables para subsanar problemas en el sistema respiratorio; poseen también un importante efecto sedante, analgésico y antiinflamatorio (Andueza, 2006; Moufarrij y col., 2014; Magrone y col., 2016).

Las aguas sulfuradas son aquellas en cuya composición predomina el azufre, lo que le da un olor característico a huevos podridos. Su administración se realiza por medio de ingestión oral principalmente. En su composición pueden ir acompañadas de sodio o calcio. Estas aguas tienen un tropismo especial por las estructuras articulares, y sobre todo por el cartílago, razón por la cual se utilizan sobre todo en afecciones reumáticas, artritis y para aliviar contracturas musculares. También se utilizan en el tratamiento del acné y algunas erupciones cutáneas, trastornos respiratorios crónicos y afecciones hepáticas (Burguera y col., 1980; Chamorro y Caballero, 2006).

Por otra parte, las aguas termales ferruginosas estimulan principalmente la hematopoyesis y las oxidaciones tisulares, siendo rápidamente absorbido el hierro disponible por vía oral. Las aguas radiactivas, debido a su contenido de gas Radón de origen natural se utilizan como sedantes y analgésicas, resaltando el hecho de que la concentración del mencionado elemento es entre mil a cinco mil veces más baja que la concentración considerada como radiación perjudicial para el organismo (Burguera y col., 1980; Chamorro y Caballero, 2006).

Otra clase de fuentes termales son las llamadas aguas sulfatadas, cuya temperatura y mineralización varían. La técnica de aplicación de este tipo de agua es por medio de la ingesta oral, aunque también es posible utilizarlas por medio de otras vías. Dependiendo del anión o catión predominante, estas aguas se pueden subdividir en:

Sulfatadas sódicas y magnésicas: tienen una importante acción laxante, para el tratamiento de las afecciones dermatológicas, prurito e incluso

resultan útiles en algunos casos de intoxicación medicamentosa o alimenticia.

Sulfatadas cálcicas: están indicadas en afecciones gástricas, intestinales, hepáticas y biliares, producen una importante acción diurética. Y contribuyen a la eliminación de ácido úrico

Sulfatadas cloruradas: están indicadas en afecciones digestivas, gastritis, estreñimiento e insuficiencia hepática.

Otro tipo de aguas menos frecuentes son las llamadas aguas radiactivas, es decir, aquellas aguas en cuyo contenido se encuentra radón(Rn) radiactivo de origen natural. Es importante destacar que este tipo de agua utilizada en termalismo no tiene ningún efecto negativo. Están indicadas para afecciones del sistema neurovegetativo, endocrino y para alteraciones en el sistema autoinmune, así como para tratar afecciones respiratorias crónicas, reumatológicas y dérmicas. Se utilizan por vía tópica en forma de baños o inhalaciones y están muy indicadas en tratamientos antiestrés, depresiones y alteraciones del sistema nervioso, ya que el radón tiene características sedativas y analgésicas (Ablin y col., 2013; Contoli y col., 2013; Keller y col., 2014). En resumen, existe una estrecha relación entre el contenido de sales minerales que contienen las aguas termales y sus propiedades terapéuticas, tal como se resume en la Tabla 6.

Tabla 6.- Propiedades terapéuticas de las aguas termales según su composición mineral

Tipo de agua	Indicaciones	Efecto terapéutico
Sulfurada	Inhalaciones e Ingestión oral	Gota, diabetes
Iodada	Ingestión oral	Trastornos circulatorios
Sulfatada	Ingestión oral	Constipación, descongestionante de la vesícula y el hígado
Litínica	Ingestión oral	Gota
Bicarbonatada	Ingestión oral	Cansancio muscular, alcaliniza el pH gástrico, efecto digestivos, estimula secreción pancreática, efecto diurético y alcalinizante de la orina
Bicarbonatada sódica	Ingestión oral	Tratamiento de la hipermotilidad intestinal, úlceras duodenales, diarreas, afecciones hepáticas y renales
Bicarbonatada Cálcica	Ingestión oral	Favorece la digestión
Bicarbonatada Sulfatada	Ingestión oral	Tratamiento de la intoxicación hepática y estreñimiento
Clorurada	Ingestión oral	Favorece la secreción glandular, mejora la circulación sanguínea
	Vía tópica (baños) e inhalatoria	Tratamiento de afecciones reumáticas y dermatológicas, efecto sedante, analgésico y antiinflamatorio
Ferruginosa	Ingestión oral	Favorece la hematopoyesis, reconstituyente en caso de anemia ferropénica, trastornos hepáticos, biliares y de desarrollo infantil
Oligometálica	Ingestión oral	Sedante, analgésico

Fuente: Modificado de Burguera y col., (1983).; Armijo y San Martín (1994).

MECANISMOS DE ACCIÓN DEL AGUA EN EL ORGANISMO

Existen diferentes modalidades de tratamientos en hidroterapia y balneoterapia y sus mecanismos de acción pueden ser de tipo mecánico, térmico, general inespecífico, químico e inclusive algunas clases de agua poseen un efecto antioxidante.

1. Factor mecánico: Es el resultado de las propiedades mecánicas del agua. Entre estas propiedades se encuentran:

a. Cohesión y viscosidad

La cohesión de un líquido es la fuerza de atracción ejercida por cada molécula respecto a las que les rodean; resulta de ello una resistencia frente a cualquier objeto que pase a través del líquido.

La viscosidad o fricción interna es la propiedad de un líquido a oponer resistencia relativa al movimiento dentro de él. A mayor cohesión, la viscosidad es mayor y todos los movimientos en cualquier dirección dentro del agua están dificultados. Este factor se aprovecha en rehabilitación para aumentar la fuerza muscular, ya que se entrena con una resistencia añadida al movimiento (Ortega, 2015).

b. Principio de Arquímedes

Según este principio, todo cuerpo sumergido en un líquido pierde una parte de su peso igual a la del peso del volumen desalojado del líquido.

c. Presión hidrostática

Cuando se introduce todo el cuerpo o una parte de él en el agua, ésta ejerce una presión sobre la parte introducida que depende de la altura absoluta del nivel de agua. Esta acción se producirá en particular sobre el sistema

venoso, las grandes cavidades corporales y las estructuras compresibles de las extremidades.

La presión del baño de agua produce un fuerte estímulo mecánico. A nivel del sistema respiratorio, facilita la espiración y dificulta la fase inspiratoria, por lo que es de utilidad en bronquitis asmática y en el enfisema. Se necesita una mayor actividad cardiaca para vencer el obstáculo a la circulación debido a la presión externa por lo que se utiliza en personas con insuficiencia cardiaca (Ortega, 2015).

d. Estímulo hidrocínético

En ocasiones, la aplicación hidroterápica y balneoterápica se realiza con una técnica que supone, además de la acción mecánica del agua, la acción hidrocínética por movimiento del agua con el correspondiente estímulo mecánico de la piel y de los tejidos subyacentes.

2. Factor térmico

El agua es un excelente medio para administrar o sustraer calor al organismo, dadas sus características de alto calor específico, considerable conductividad térmica, etc., que le permiten almacenar gran cantidad de calor y también perderlo muy lentamente. Su acción depende de los siguientes factores:

Diferencia de temperatura entre el medio estimulante y la parte del cuerpo estimulada (agua y piel), a mayor diferencia, mayor es el estímulo.

Conductividad térmica del medio estimulante, a mayor conductividad, más intenso es el estímulo (alta en el agua, menos en el aire).

Conductividad térmica del medio estimulado.

Capacidad calorífica del medio estimulante (alta en el agua).

Duración del estímulo: Modifica las reacciones, por ejemplo, una aplicación fría rápida consigue un estímulo de vasoconstricción y si se realiza de forma continuada, produce una vasodilatación por la reacción

vasomotora. Siempre existe una primera fase de vasoconstricción, una segunda de vasodilatación y una tercera de éxtasis circulatorio.

Extensión o área de aplicación.

Sensibilidad individual y topográfica. Hay partes del cuerpo más sensibles a las variaciones de temperatura, por ejemplo, la espalda.

Hábito en recibir el estímulo (Armijo y San Martín, 1995).

3. Factor de mediación por respuestas sistémicas

La hidroterapia y la balneoterapia son modelos de terapias mediadas por respuestas sistémicas (inespecíficas). Cuando se realiza una aplicación de agua fría, con suficiente intensidad, y la persona posee una buena capacidad de reacción, se produce además de diversos efectos locales (mecánicos, térmicos y químicos), una reacción general inespecífica, llamada así porque diversos agentes estresantes pueden originarla (Ortega, 2015).

4. Factor químico

Este factor se considera sólo para las aguas mineromedicinales. La absorción de las sustancias químicas presentes en estas aguas depende de:

La temperatura, mayor con agua fría o caliente que con la neutra.

Presión osmótica, disminuye con el aumento de la presión.

Contenido de O₂ y CO₂, que favorecen la absorción.

5. Factor psicológico

Es importante sobre todo en las personas con patologías que dificultan el movimiento, ya que la inmersión en el agua mejora la capacidad funcional articular aprovechando los factores de favorecimiento y resistencia del medio hidrotermal. Además, el agua fría provoca una sensación de estímulo o vigilia, y el agua caliente una sensación de somnolencia, sedación y sueño (Armijo y San Martín, 1995).

MICROORGANISMOS DE LAS AGUAS

Las acumulaciones de agua en forma de charcos, ríos, lagos o mares constituyen ecosistemas en cuya mayoría pueden vivir microorganismos. Desde el punto de vista del origen geográfico es posible distinguir entre aguas continentales o interiores, tales como las de los manantiales, lagos y ríos, y aguas de mar, es decir, provenientes de los océanos con sus zonas marginales. En cada clase de agua predominan una serie de condiciones fisicoquímicas de las cuales depende la composición de las comunidades biológicas y de la microbiota (bacterias, hongos, virus).

Particularmente, en el caso de las aguas subterráneas o freáticas suele existir una microflora escasa debido a su contenido limitado de materias nutritivas, lo que a su vez ocasiona la inexistencia de flora y fauna a diferencia de otros ecosistemas acuáticos. La microbiota bacteriana de las aguas no suele ser uniforme, sino que ofrece una extraordinaria variedad como sucede con la de la tierra (Rheinheimer, 1987; Madigan y col., 2004).

Además de las bacterias autóctonas de un determinado cuerpo de agua y que sólo pueden desarrollarse óptimamente en dicho medio, existen otras bacterias en menor proporción que proceden de otros biotopos. En este sentido, en el agua dulce viven también bacterias de la tierra, sobre todo cuando esta se encuentra próxima a corrientes acuosas. Por otra parte, sobre las aguas superficiales caen constantemente bacterias del aire y otras provenientes de fuentes de contaminación como las plantas, los animales y el hombre.

La composición de la flora bacteriana es muy variable según la clase de agua, depende principalmente de la concentración de sales y sustancias orgánicas, de la temperatura y de las fuentes de contaminación que estén presentes. La mayoría de las bacterias de las aguas son heterótrofas y saprófitas mientras que el número de bacterias parásitas suele ser escaso.

También es posible encontrar en el agua bacterias fotoautótrofas y quimioautótrofas.

Las bacterias acuáticas presentan las mismas formas que las bacterias terrestres (esféricas, bacilares, en forma de coma o en espiral) exhibiendo con frecuencia grandes diferencias de tamaño entre especies. En la mayoría de las aguas predominan las bacterias gramnegativas móviles mediante flagelos, aunque algunas reptan sobre sustratos sólidos. Las bacterias autóctonas de las aguas se caracterizan por utilizar concentraciones muy bajas de principios nutritivos y pueden vivir libremente en ellas o sobre la superficie de sustratos sólidos, tales como detritos o en el moco de las algas (De la Rosa y Mosso, 2000).

INFLUENCIA DE LOS FACTORES FÍSICOS Y QUÍMICOS SOBRE EL CRECIMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS DE LAS AGUAS

www.bdigital.ula.ve

Existen una serie de factores físicos y químicos que influyen sobre el desarrollo de los microorganismos de las aguas, bien sea favoreciéndolo o inhibiéndolo. Esta influencia no sólo repercute en el volumen y la composición específica de las poblaciones microbianas, sino también en la morfología y fisiología de las bacterias, cianofíceas y hongos. En este sentido, la luz, los valores de pH y las temperaturas que se encuentren alejados de los valores óptimos, pueden alterar considerablemente el metabolismo, la forma celular y la reproducción de algunas especies.

En relación a la luz, esta constituye un factor ecológico importante dentro de los ecosistemas acuáticos, ya que a medida que aumenta la profundidad de las aguas disminuye la intensidad de la luz y, por consiguiente, inhibe el crecimiento de las bacterias fotoautótrofas que requieren de este factor para llevar a cabo la fotosíntesis. Respecto al valor de pH del medio acuático, este influye significativamente en el crecimiento y

reproducción de los microorganismos, puesto que la mayoría de los microorganismos crecen a un pH entre 4 y 9. Sólo algunas especies crecen a pH extremos, como es el caso del termófilo *Sulfolobus acidocaldarius*, que habita en fuentes azufradas calientes con valores de pH comprendidos entre 1,6 y 3 (De la Rosa y Mosso, 2000).

Con respecto a la temperatura, la cual es un factor de interés particular en los manantiales de aguas termales, esta influye sobre la tasa de crecimiento, las necesidades nutritivas y en cierta medida sobre la composición enzimática y química de las células. De acuerdo a la capacidad de desarrollarse en diferentes rangos de temperatura es posible distinguir tres grupos de bacterias (Tabla 7).

Tabla 7.- Clasificación de las bacterias de acuerdo a sus requerimientos de temperatura

Grupo de bacterias	Rango de temperatura(°C)		
	Mínimo	Óptimo	Máximo
Psicrófilas	-10 a 5	10 a 20	13 a 25
Mesófilas	10 a 15	25 a 40	30 a 50
Termófilas	25 a 45	50 a 75	75 a 100

Fuente: Modificado de Madigan y col., (2004).

Entre estos grupos de microorganismos no existe un límite definido sino más bien una transición gradual, incluso es posible que algunos de estos microorganismos se adapten a temperaturas mayores o menores a las establecidas en su rango de crecimiento. Específicamente en el caso de los ambientes extremos como las aguas termales, las adaptaciones que han desarrollado las bacterias a este tipo de ecosistemas resultan de interés en la búsqueda de metabolitos bioactivos o de aplicación industrial (Madigan y col., 2004; Sahay y col., 2017).

METODOLOGÍA PARA EL ESTUDIO MICROBIOLÓGICO DE AGUAS

La mayoría de la metodología que se aplica en el estudio microbiológico del suelo es aplicable al estudio del hábitat acuático. Los sedimentos presentan dificultades ya que constituyen entornos no homogéneos, estableciéndose estratos óxicos y anóxicos próximos, que son perturbados por la manipulación del equipo de muestreo de agua y de sedimentos. La principal dificultad es el hecho de tener que examinar grandes volúmenes de agua por la escasa concentración de gérmenes, así como las diferencias de temperatura y presión existentes entre el lugar de extracción de la muestra y la superficie.

Con el objetivo de cultivar y calcular la cifra de microorganismos acuáticos relativamente dispersos es necesario concentrar y en ocasiones separar mediante fraccionamiento por tamaño, lo cual se realiza atrapando las células en filtros selectores por el tamaño del poro. La estimación de los gérmenes en el agua suele tener algunas limitaciones. Se puede realizar a partir de las muestras filtradas las cuales se tiñen para realizar recuentos microscópicos directos (tinción por cromógenos fluorescentes y examen utilizando microscopia de epifluorescencia), o pueden depositarse sobre medios nutritivos para el desarrollo de los microorganismos (Mosso y col., 2006; Ortega, 2015; Seguí, 2016).

MICROORGANISMOS DE LAS AGUAS TERMALES

Los microorganismos están presentes en todos los nichos ecológicos concebibles, desde los trópicos hasta los polos, aguas termales y chimeneas hidrotermales. Particularmente, los ambientes de alta temperatura de interés en microbiología, generalmente no exceden el punto de ebullición del agua (91- 101°C) dependiendo de la altitud. Entre esta clase de ambientes se incluyen las aguas termales, las áreas sobrecalentadas por las radiaciones

solares de gran intensidad y las acumulaciones de material orgánico autocombustible. Los ambientes geotérmicos albergan gran cantidad de microorganismos termófilos, particularmente quimiolitótrofos (Sahay y col., 2017).

Uno de los estudios precursores sobre aislamiento de microorganismos en fuentes termales fue efectuado por March y Larsen en el año de 1952 (citado por Andueza, 2006), en las fuentes termales del parque nacional de Yellowstone en Estados Unidos, quienes lograron aislar e identificar 24 cepas bacterianas, formadoras de esporas, capaces de crecer a 67°C, de las cuales 21 cepas fueron identificadas como *Bacillus stearothermophilus* y el resto presentaron características similares a *Bacillus coagulans* según las pruebas bioquímicas establecidas por la NCA (National Canners Association).

Además de su temperatura generalmente elevada con respecto a la temperatura atmosférica, las fuentes termales generalmente son muy ácidas (pH inferior a 4 como consecuencia de los compuestos de azufre oxidados) o muy alcalinas (pH superior a 8 debido a la presencia de carbonatos y bicarbonatos metálicos, presencia de iones sodio y calcio). En los manantiales termales sulfurosos ácidos con temperaturas mayores a los 60°C es posible encontrar especies como *Sulfolobus acidocaldarius* y *Thiobacillus* spp. (Madigan y col., 2004; Littlechild, 2015).

Los procariontes que residen en hábitats termófilos han experimentado adaptaciones fisiológicas a las altas temperaturas y estrés químico. Recientemente estas comunidades han captado la atención de la investigación aplicada no sólo como prospectos biotecnológicos sino también para entender el uso de los análogos precursores de las biomoléculas existentes en la tierra primitiva (Sahay y col., 2017).

En manantiales sulfurosos con temperaturas entre los 50- 60°C se encuentran procariontes que incluyen el alga rodófica *Cyanidium caldarium*,

que se desarrolla con determinadas especies de hongos y *Bacillus* spp. termófilos. Por otra parte, en las fuentes alcalinas a temperaturas de hasta 70°C se encuentran bacterias como *Bacillus* spp., metanógenos termófilos similares al *Methanobacterium thermoautotrophicum* y la especie *Thermus aquaticus*, un bacilo que ha colonizado gran cantidad de ambientes térmicos artificiales y que contribuyó al desarrollo de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa o PCR gracias a que permitió la obtención de la enzima Taq polimerasa (Figura 2).



Fuente: Madigan y col., (2004)

Figura 2. Microfotografía electrónica de *Thermus aquaticus*

En la Tabla 8 se resumen los límites de crecimiento a altas temperaturas de los principales grupos de seres vivos, incluyendo los procariontes, resaltando la importancia de los termófilos como seres microscópicos adaptados a la supervivencia en ambientes extremos.

Tabla 8.-Límites de temperatura para el crecimiento de seres vivos

Grupo	Límite térmico superior (°C)
Microorganismos eucariotas	
Protozoos	56
Algas	55 - 60
Hongos	60 - 62
Procariontas	
<i>Bacteria</i>	
Cianobacterias	70 - 74
Fotótrofos anoxigénicos	70 - 73
<i>Bacteria</i>	
Quimiorganotrofas/quimiolitotrofas	95
Archaea	
Archaea	
Quimiorganotrofas/quimiolitotrofas	113

Fuente: Madigan y col., (2004)

Las aguas termales son puntos calientes de biodiversidad de microorganismos que pueden ser utilizados como fuente de nuevos genes, enzimas y moléculas hidrolíticas con aplicación en la agricultura, la medicina y los procesos industriales. Se han aislado gran variedad de microorganismos termófilos en todo el mundo, tal es el caso de *Thermoanaerovibrio velox* en Rusia, *Caldimonas taiwanensis* en Taiwan, *Caldisphaera lagunensis* en Filipinas, *Caloramator viterbensis* en Italia *Thermoanaerobacter italicus* y *Thermoanaerobacter mathranii*, *Geobacillus stearothermophilus* y *Brevibacillus brevis* (De la Rosa y Mosso, 1995; Viviano y col., 2010; Littlechild, 2015).

Se han identificado y caracterizado también en los últimos dos decenios, termófilos noveles tales como *Thermotoga elfii*(1995), *Thermotoga hypogea* (1997), *Thermoanaerobacter uzonensis*(2008) y *Herbinix luporum* (2016). Las enzimas termoestables aisladas de microorganismos termófilos han resultado de gran relevancia desde el punto de vista comercial e industrial debido a su inherente estabilidad en procesos industriales

exigentes así como también su desempeño estable a altas temperaturas (Sarmiento y col., 2015; Sahay y col., 2017).

Las fuentes de aguas termales proveen evidencia de las formas de vida primitivas, y se han convertido en fuentes especiales de moléculas bioactivas para los biotecnólogos modernos, razón por la cual numerosos países están haciendo esfuerzos por enfocar sus investigaciones hacia la exploración y conservación de estas bio-fuentes disponibles en sus ecosistemas naturales. De manera general, esta amplia diversidad bacteriana típica de las poblaciones acuáticas se puede agrupar en dos grandes clases de microorganismos: autóctonos y alóctonos.

Microorganismos Autóctonos

Según De la Rosa y Mosso (1995), las bacterias autóctonas de las aguas crecen mejor en medios pobres en carbono y con tiempos de incubación prolongados; mientras que las bacterias heterótrofas oligotróficas, crecen con escasos requerimientos de carbono y nitrógeno (oligocarbofílicas y oligonitrofilicas). En los ambientes extremos, la diversidad de los microorganismos autóctonos va a depender de las características fisicoquímicas (temperatura, pH y composición mineral) de cada tipo de manantial (Rubiano, 2006).

En el lugar de emergencia de los manantiales termales la población microbiana puede ser alta, con una media de 10^6 UFC/mL. No obstante, muchos de estos microorganismos pueden encontrarse en forma latente, son metabólicamente inactivos y no se multiplican, por lo que el número de los viables suele ser menor, generalmente de $10-10^3$ UFC/mL dependiendo de la temperatura de incubación y de los medios de cultivo empleados en su detección (De la Rosa y Mosso, 1995).

Las bacterias aisladas con mayor frecuencia del medio acuático son los bacilos gramnegativos y de hecho el 90% de todos los aislamientos pertenecen a esta categoría, incluyendo por lo general especies de *Vibrio*, *Pseudomonas* y *Flavobacterium* u organismos relacionados. Numerosas bacterias pequeñas (0.2-0.5 μm) no identificadas del plancton también ostentan una pared celular con estructura de gramnegativos. Los sedimentos contienen un porcentaje muy superior de gérmenes grampositivos, principalmente *Bacillus* spp. (Cabral, 2010).

En aguas naturales con bajo contenido de nutrientes y que han permanecido inalteradas durante largos periodos de tiempo, se observan distintas formas morfológicas que rara vez pueden ser mantenidas en cultivo. Los microorganismos con morfología poco frecuente tales como formadores de prostecas (extensiones del citoplasma), microcolonias filamentosas, anulares, reticulares o planas, constituyen una proporción significativa de la microbiota de dichas aguas.

Para resolver el problema de la flotabilidad en la columna de agua, a veces los microorganismos adquieren un tamaño pequeño, motilidad o forman burbujas gaseosas. Las vesículas de aire aparecen en muchas algas verde-azuladas y en bacterias acuáticas fototróficas y quimioorganotróficas, particularmente en las encontradas en el hipolimnion de los lagos eutróficos. Estructuras similares utilizan las halobacterias para mantenerse en los estanques salinos y otro mecanismo es el de las bacterias móviles del sedimento, que poseen guarniciones axiales de partículas de hierro y muestran movimientos magnetotáxicos en dirección a los polos magnéticos. Por su parte, los hongos predominan más en las aguas dulces que en las aguas saladas y prevalecen en la descomposición de los residuos vegetales recientes (Grant, 1989).

Microorganismos Alóctonos

En algunos manantiales termales se ha detectado la presencia de microorganismos alóctonos tales como coliformes, *Enterococcus*, y *Clostridium* sulfitorreductores entre otros. La presencia de coliformes totales no es un riesgo sanitario ya que pueden proceder del suelo o de los vegetales y sobreviven en ambientes acuáticos por su facilidad de adaptación. No obstante, existe controversia para considerar a los *Enterococcus* y *Clostridium* sulfitorreductores indicadores de una contaminación fecal cuando aparecen ocasionalmente como único indicador, debido a su mayor supervivencia, habiéndose encontrado en ambientes donde no existe contaminación fecal, por lo que en aguas poco contaminadas como los manantiales minerales, se recomienda utilizar varios indicadores, siendo *Escherichia coli* el más significativo. La presencia de *Pseudomonas aeruginosa* en las aguas minerales no es deseable por ser un patógeno oportunista que puede producir infecciones en algunas personas (De LaRosa y Mosso, 2009).

Uno de los estudios más recientes sobre diversidad microbiana en aguas termales utilizando el enfoque tradicional de la microbiología fue llevado a cabo por Sahay y col., (2017), quienes estudiaron el ecosistema montañoso del Himalaya en la India, el cual alberga aguas termales en algunas sus regiones. Dicho ecosistema posee sitios extremos “fríos” y “calientes” para explorar la diversidad microbiana que aún no han sido estudiados debido a la dificultad para el acceso de actividades humanas, particularmente, existen pocos reportes de biodiversidad en manantiales localizados en elevaciones montañosas de gran altitud.

En su trabajo de investigación, Sahay y col., (2017) lograron aislar un total de ciento cuarenta bacterias termofílicas a partir de doce muestras (seis de cada fuente) colectadas en las aguas termales de Manikaran y Yumthang. Estas fuentes termales son las más calientes del país, con temperaturas que

oscilan entre los 89-95°C, lo que las convierte en un pool de posibles nuevos genes, microorganismos y enzimas. Las fuentes de Manikaran están ubicadas en el valle geotermal de Beas y Parvati, situado a 1760 m.s.n.m., mientras que las de Yumthang se encuentran al norte del distrito de Sikkim a una altitud de 3564 m.s.n.m.

Los mencionados investigadores emplearon seis medios de cultivo distintos para recuperar las bacterias cultivables de ambas aguas termales utilizando el método de enriquecimiento en caldo nutriente y la técnica de dilución seriada para recuento en placa. Todas las muestras fueron incubadas a 60°C durante 2 horas y posteriormente se tomaron alícuotas de 100µL de las muestras enriquecidas para hacer las diluciones. Los medios de cultivo fueron diseñados con concentraciones específicas de sales minerales, extracto de levadura y peptona entre otros componentes y fueron denominados medio Thermus, medio Thermus potenciado, medio extracto de levadura triptona, medio Thermus thermophilus, agar nutriente y medio R2A. Todas las muestras fueron sembradas e incubadas en los medios descritos a 60°C por 6-15 días.

Los aislados bacterianos fueron identificados mediante secuenciación de nueva generación y se analizaron a través de perfiles filogenéticos, observándose variaciones entre las especies en cada localización geográfica. Se evaluaron las propiedades de crecimiento de los aislados bajo diferentes condiciones de temperatura, obteniéndose dos agrupaciones de microorganismos: Termotolerantes (37-60°C) y Termofílicos (60-90°C). La mayoría de los aislados crecieron a 45°C, mientras que sólo 10 de ellos crecieron a 65°C. Los géneros *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Thermobacillus* y *Geobacillus* demostraron tolerancia a 90°C por 30 minutos.

Sahay y col., (2017) lograron seleccionar en base a su producción de hidrolasas extracelulares termoestables tales como proteasas, amilasas, xilanasas y celulasas, un total de cincuenta y un aislados, a saber, veintiocho provenientes de las aguas termales de Manikaran y veintitrés de

las fuentes de Yumthang. Estos aislados fueron identificados mediante secuenciación de genes 16SrRNA, resultando un total de 37 especies diferentes pertenecientes a los géneros *Anoxybacillus*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Brevundimonas*, *Burkholderia*, *Geobacillus*, *Paenibacillus*, *Planococcus*, *Pseudomonas*, *Rhodanobacter*, *Thermoactinomyces*, *Thermobacillus*, *Thermonema* y *Thiobacillus*.

Por otra parte, los investigadores hallaron veinticuatro aislados distintos a los productores de hidrolasas, que demostraron estabilidad frente a un amplio rango de temperaturas y tratamientos de pH. Adicionalmente, tres bacterias termotolerantes nombradas *Thermobacillus* sp. NBM6, *Paenibacillus ehimensis* NBM24 y *Paenibacillus popilliae* NBM68 resultaron productoras de xilanasas, que son enzimas hidrolíticas termoestables con un gran prospecto comercial en diversas industrias, aplicaciones médicas y agricultura.

En contraste con el estudio anterior, Ghilamical y col., (2017) estudiaron el contenido total de rDNA en cinco aguas termales localizadas en las tierras bajas al oriente de Massawa, en Eritrea, país situado al noreste de África, usando secuenciación de alto rendimiento y posterior comparación de los códigos genéticos encontrados con librerías metagenómicas.

La finalidad del mencionado trabajo fue determinar la diversidad de microorganismos pertenecientes a los dominios Bacteria y Archaea en el agua, sedimento húmedo y tapetes microbianos de las fuentes termales seleccionadas por poseer condiciones químicas distintas, ya que sus temperaturas varían en un rango desde 49.5 °C hasta 100 °C, mientras que el pH varía de 6,97 a 7,54.

Las fuentes termales de Awkar y Maiwooi se caracterizan por sus altos niveles de carbonatos, mientras que las fuentes de Garbanabra y Gelti, ubicadas cerca de la costa de Eritrea son más salinas, con altos niveles de sodio y cloruros. Las fuentes termales de Elegedi, ubicadas en la costa volcánica de Alid, poseen la mayor temperatura, concentraciones de hierro y

sulfato. Las muestras en cada una de las fuentes termales analizadas fueron colectada bajo condiciones asépticas, por triplicado y el muestreo fue realizado tres veces al día: en la mañana de 7.00 a 9.00 am, al mediodía de 12.00 a 1.00 pm y en la tarde de 4.00 a 6.00 pm. En los extractos de DNA de las muestras se llevó a cabo la amplificación por PCR de la 16S rRNA en la región variable V4-V7 usando primers 515F (GTGCCAGCMGCCGCGGTAA).

Los autores encontraron que las cinco aguas termales resultaron compartir 901 de las 4371 OTUs recuperadas (OTUS del inglés "Unidades taxonómicas operacionales", que equivalen a 97% de similaridad filogenética), mientras que los tres tipos de muestra (agua, sedimento y tapete microbiano) también compartieron 1429 OTUs. Además de esto, ciertos géneros estuvieron correlacionados con variables como la temperatura, concentración de sodio, carbonato, hierro y niveles de amonio en el agua.

En cuanto a la abundancia de los Phyla que los autores encontraron en las cinco aguas termales se pueden mencionar en primer lugar el Phylum Proteobacteria (6,2-82,3%), seguido por Firmicutes (1,6-63,5%), Deinococcus-Thermus (0,0 -19,2%), Planctomycetes (0,0-11,8%), Aquificae (0,0-9,9%), Chlorobi (0,0-22,3%) y Bacteroidetes (2,7-8,4%). En el dominio Bacteria los OTUs fueron distribuidos en doscientas setenta y dos familias, siendo las más abundantes *Pseudomonadaceae* (8.7%), *Comamonadaceae* (5.2%), *Thermaceae* (5.1%), *Caulobacteraceae* (4.9%), *Sphingomonadaceae* (4.3%), *Bacillaceae* (4.1%), *Rhodospirillaceae* (3.4%), *Planctomycetaceae* (3.3%) y *Rhodobacteraceae* (2.7%).

A partir de los hallazgos de los autores el estudio concluye que existen diferencias significativas en la estructura de la comunidad microbiana presente en las cinco localidades de aguas termales y en los tipos de muestras analizadas. La existencia de géneros como *Aquificae*, *Deinococcus-Thermus*, algunas *Cyanobacteria* y *Crenarchaeota* fueron altamente dependientes de la temperatura de las aguas. El género

Halobacterium mostró una correlación significativa con la salinidad predominante en las aguas termales de Garbanabra y Gelti. El género Firmicutes fue mayor en las muestras de tapetes microbianos, mientras que las Archaea resultaron mayormente presentes en las muestras de sedimento húmedo.

ADAPTACIONES MOLECULARES DE LOS MICROORGANISMOS A LAS ALTAS TEMPERATURAS

Las enzimas y otras proteínas de los termófilos son estables a altas temperaturas, a pesar de que su secuencia difiere en muy pocos aminoácidos a la de una enzima que cataliza la misma reacción en un mesófilo. Probablemente la sustitución de un aminoácido crítico en uno o en pocos sitios de la enzima hace que se pliegue de tal modo que sea termoestable. La estabilidad de las proteínas en los hipertermófilos también se debe a un aumento en el número de puentes iónicos presentes y al denso empaquetamiento del interior altamente hidrofóbico de las proteínas, lo que hace que resistan la desnaturalización en el ambiente acuoso del citoplasma (Madigan y col., 2004).

Adicionalmente, los hipertermófilos producen ciertos solutos en cantidades significativas como el di-inositol fosfato, diglicerol fosfato y manosilglicerato, y ayudan a estabilizar las proteínas evitando su degradación térmica. Otro aspecto que favorece la resistencia a las altas temperaturas en los termófilos es la composición de la membrana citoplasmática, la cual es rica en ácidos grasos saturados, que confiere una mayor estabilidad. En el caso de los hipertermófilos, pertenecientes al dominio *Archaea* en su mayoría, la membrana es una monocapa formada por carbohidratos de tipo C40 mucho más resistente que la bicapa lipídica de los miembros del dominio *Bacteria* (Forbes y col., 2004; Madigan y col., 2004).

ENZIMAS DE MICROORGANISMOS AISLADOS DE FUENTES TERMALES

Las enzimas presentes en los microorganismos aislados de fuentes termales generalmente reciben la denominación de extremoenzimas, ya que son proteínas especializadas en catalizar reacciones químicas en ambientes extremos, bien sea a temperaturas muy altas o muy bajas, valores de pH ácidos o básicos, altas presiones, concentraciones de sales o de metales elevadas, entre otros. Generalmente los microorganismos poseedores de estas enzimas son microorganismos extremófilos, es decir, que viven en condiciones que resultan letales para otros microorganismos. Algunas de las enzimas aisladas con mayor frecuencia en bacterias termófilas, tanto moderadas como hipertermófilas son las amilasas, xilanasas, proteasas, DNA polimerasas, enzimas celulolíticas y lipolíticas (Forbes y col., 2004; De Castro y col., 2016).

Actualmente, las industrias requieren procesos tecnológicos eficientes y limpios que soporten temperaturas y pH extremos, por esta razón, el aislamiento de nuevos microorganismos de ambientes extremos o sus enzimas constituye una alternativa para la obtención de bacterias con características particulares para atender la creciente demanda del mercado biotecnológico (Borja y col., 2012). Entre las aplicaciones tecnológicas más importantes de estas enzimas se encuentran la obtención de glucosa y fructosa utilizada en la elaboración de edulcorantes, blanqueo de papel a escala industrial, fermentaciones, degradación de residuos de detergentes, herramientas utilizadas en ingeniería genética, entre otras (Prescott y col., 2002; Forbes y col., 2004).

Los microorganismos extremófilos representan una fuente subutilizada e innovadora de nuevas enzimas. Las propiedades intrínsecas de las enzimas microbianas, tales como consistencia, reproducibilidad y alto rendimiento entre otras, han impulsado su introducción en una amplia gama

de productos y procesos industriales. Estos microorganismos han desarrollado mecanismos únicos para hacer frente a temperaturas extremas, pH ácido y básico, alta salinidad, alta radiación, baja actividad de agua y altas concentraciones de metales entre otras condiciones ambientales.

Según De Castro y col., (2016), las poblaciones microbianas de termófilos son capaces de producir un gran número de enzimas resistentes al calor (termozimas), útiles como biocatalizadores novedosos. El uso de la metagenómica y herramientas bioinformáticas ha permitido profundizar en el estudio de la diversidad taxonómica de estos ecosistemas acuáticos y el posterior aislamiento de sus enzimas.

Las enzimas derivadas de los microorganismos extremófilos, o enzimas extremas, son capaces de catalizar reacciones químicas en condiciones difíciles, como las encontradas en los procesos industriales, que antes no se pensaba que fueran conducentes a la actividad enzimática.

Estas enzimas también constituyen el punto de partida para el desarrollo de tecnologías industriales respetuosas con el medio ambiente, eficientes y sostenibles (Satpal y Panda, 2011; Bueno y col., 2015).

Las enzimas extremófilas tienen aplicaciones específicas en biotecnología industrial, una de estas lo constituye el área de biocatálisis, es decir, en la catalización de una variedad de conversiones químicas que previamente eran llevadas a cabo por la química tradicional. La ventaja del proceso biocatalítico, es que este se realiza en condiciones suaves y con una mayor especificidad. Además de esto, el proceso enzimático no da lugar a los desechos tóxicos que normalmente se producen en un proceso químico que posteriormente requeriría una eliminación cuidadosa.

En este sentido, el proceso biocatalítico se denomina "química verde" o ecológica. Algunas de las enzimas extremófilas utilizadas en procedimientos industriales son la l-aminoacilasa, γ -lactamasa, transaminasas, anhidrasas carbónicas, deshalogenasas, esterases específicas, epóxido hidrolasas y las más comúnmente empleadas a escala

industrial: amilasas, celulasas, lipasas y proteasas (Mohammed y col., 2013; Littlechild, 2015).

Mohammad y col., (2017) efectuaron un trabajo de investigación cuyo objetivo fue el aislamiento y caracterización de bacterias termofílicas a partir de aguas termales en Jordania. En dicho país se han reportado aproximadamente doscientas fuentes termales a lo largo de toda su geografía, cuya temperatura varía entre 30 a 63°C. Los investigadores escogieron cinco localidades con fuentes termales denominadas Hammamat Ma'in, Zara Dead Sea, Hammamat Afra, Al-Burbita, y Al-Hemma. En cada localidad recolectaron muestras por triplicado de agua termal en el mismo punto de muestreo a tres profundidades distintas (10, 20 y 30 cm). Las muestras fueron inmediatamente enriquecidas en caldo nutriente e incubadas a 55°C.

En dicho estudio, se obtuvieron un total de diez aislados que fueron caracterizados en base a su morfología, características microscópicas, bioquímicas, moleculares y fisiológicas utilizando galerías API 50CHB (BioMerieux, Francia). La secuenciación de la subunidad 16SrDNA de los aislados reveló que nueve cepas correspondían a la especie *Bacillus licheniformis* y un aislado fue identificado por primera vez en aguas termales de Jordania como *Thermomonas hydrothermalis*.

Adicionalmente, los aislados demostraron la habilidad de producir algunas enzimas termoestables tales como celulasa, ensayada por incubación en placas de CMC e incubación a 37°C por 5 días, actividad proteasa en Agar Mueller-Hinton suplementado con leche descremada al 3%, producción de gelatinasa en agar nutriente con gelatina al 3%, actividad amilasa en placas de agar almidón y producción de lecitinasa en agar tripticasa soya con yema de huevo. En esta investigación, también se construyó un dendrograma de las características enzimáticas de los diez aislados, cuyos resultados evidenciaron una alta diversidad fenotípica, lo que

constituye un punto de partida para futuros estudios destinados a explorar aplicaciones industriales y ambientales.

Por su parte, Seguí (2016) realizó un estudio comparativo de la diversidad microbiana de veintidós manantiales hipertermales en España. Los resultados evidenciaron que dichos manantiales albergan poblaciones microbianas predominantemente mesófilas y oligotrofas, adaptadas a las altas temperaturas. Entre los principales géneros de bacterias encontrados en los manantiales se encuentran *Pseudomonas* (81%), *Bacillus* (76%), *Staphylococcus* (67%), *Celullomonas* (57%) y *Micrococcus* (52%), *Enterobacter* (52%), entre otros. Las principales actividades biológicas encontradas en el mencionado estudio fueron actividad proteasa, amilasa y amonificante.

Badoei-Dalfard (2016), logró aislar a partir de las aguas termales de Jooshan en Kerman, Iran, veinticuatro cepas pertenecientes al género *Pseudomonas*, de las cuales siete resultaron capaces de producir la enzima L-asparaginasa. Esta enzima se caracteriza por sus múltiples aplicaciones médicas e industriales, e inclusive, desde que se demostró la actividad antitumoral de la L-asparaginasa, su producción utilizando sistemas microbianos ha atraído considerable atención debido a su naturaleza rentable y respetuosa con el medio ambiente. Particularmente, la cepa identificada a partir de la secuenciación de la subunidad 16S rARN como *Pseudomonas pseudoalcaligenes* demostró mayor actividad enzimática en condiciones experimentales.

Kumar y col., (2014) estudiaron las fuentes termales de Taptapani, ubicadas en Odisha, India, logrando aislar e identificar las especies *Bacillus barbaricus*, *Aeromonas veronii* y *Stenotrophomonas maltophilia*, las cuales resultaron productoras de amilasas cuyos pesos moleculares (19 kDa, 56 kDa y 49 kDa, respectivamente) resultan similares a los encontrados en enzimas aisladas de *Aeromonas hydrophila* en estudios similares. Estas

enzimas obtenidas a partir de un ambiente extremo resultan de especial interés debido a su posible estabilidad bajo condiciones ácidas.

A temperaturas elevadas, podría incrementarse la solubilidad del almidón, disminuir la viscosidad, limitar la presencia de contaminantes microbianos y reducir el tiempo de reacción, por lo que dichas enzimas constituyen una fuente prometedora de aplicaciones industriales. Además de esto, las amilasas aisladas de las cepas en estudio resultaron resistentes en presencia de algunos antibióticos, por lo que probablemente podrían tener aplicaciones en fármacos.

Aaniz y col., (2015), investigaron la diversidad de bacterias termofílicas en distintos ambientes extremos, tales como aguas termales, marismas salinas y desiertos en Marruecos, al norte de África. En total fueron recuperadas e identificadas doscientos cuarenta (240) bacterias termofílicas, caracterizadas como bacilos grampositivos, formadoras de esporas y halotolerantes. Los aislados recuperados fueron identificados por secuenciación de la subunidad 16S rRNA como pertenecientes en su mayoría al género *Bacillus* (97,5%), encontrándose las siguientes especies *B. licheniformis*, *B. aerius*, *B. sonorensis*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. tequilensis* y *B. pumilus*, siendo la primera vez que se describen las especies *B. aerius* y *B. tequilensis* como bacterias termofílicas. Adicionalmente, se encontró que seis de los aislados pertenecían al género *Aeribacillus*, representado por *A. pallidus* y *Aeribacillus* sp. Por otra parte, en esta investigación se encontró que aproximadamente el 71,25% del total de cepas aisladas exhibía una elevada actividad amilolítica, el 50,41% actividad proteolítica y el 5,41% actividad celulolítica.

Satpal y Panda (2011), aislaron tres bacterias termófilas productoras de lipasa (denominadas AK-P1, AK-P2 y AK-P3) a partir de la fuente termal de Taptapani en Orisha, India. Las lipasas extracelulares procedentes del sobrenadante de cultivo libre de células bacterianas se hicieron reaccionar en una mezcla de aceite de oliva y se compararon sus actividades lipolíticas.

Los mencionados autores demostraron que la cepa AK-P3 exhibió la actividad lipolítica más alta (5,5 U / mL) fue identificada como *Porphyrobacter* sp. Las cepas AK-P1 y AK-P2 también demostraron actividades lipolíticas (4.5 U / mL y 3.5 U / mL, respectivamente) y fueron identificadas como *Acinetobacter* sp. y *Brevibacillus* spp. este estudio corrobora una de las posibles aplicaciones biotecnológicas de las especies bacterianas en los manantiales termales.

Mohammed y col., (2013), aislaron lipasas o triacilglicerol hidrolasas en cepas provenientes de distintas regiones de Irán, obtenidas de aguas termales, del Golfo pérsico, áreas desérticas y suelos contaminados con aceite. Entre las especies aisladas e identificadas como productoras de lipasa en este estudio, resalta *Bacillus pumilus* cuya lipasa extracelular demostró la mayor actividad total después de la liofilización del sobrenadante, también demostró una elevada termoestabilidad y afinidad por los compuestos alcalinos, lo que la hace conveniente para aplicaciones industriales.

En el contexto latinoamericano, Talavera (2019) realizó un estudio de las aguas termales del balneario Cununyacu ubicado en la Provincia de Pichincha, Ecuador, estableciendo cinco puntos de muestreo en los que realizó tomas de muestra durante los meses de noviembre y diciembre 2018, logrando aislar e identificar mediante el sistema comercial de identificación Microgen® las siguientes géneros y especies bacterianas: *Bacillus* spp., *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Moraxella* spp., *Burkholderia pseudomallei*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus* spp. y *Micrococcus* spp.

De los aislados identificados, el 23% demostró actividad amilolítica y capacidad de degradación de petróleo, 20% resultaron con actividad lipolítica, 17% resistentes al plomo, 11% proteolíticas y 6% celulolíticas. En cuanto al recuento de aerobios heterótrofos mesófilo, la mencionada autora encontró un promedio de 1,875 x 10³UFC/mL, resultando en un mayor

recuento microbiano en las piscinas de aguas termales en comparación con las nacientes.

Adicionalmente, Talavera evaluó la sensibilidad de los aislados frente a una serie de antimicrobianos resultando que la especie *Burkholderia pseudomallei* fue resistente al antibiótico Ampicilina/Sulbactam (20µg), mientras que las especies *Bacillus subtilis*, *Micrococcus* spp. y *Bacillus* spp. fueron resistentes a la Oxacilina. El estudio concluye que el balneario Cununyacu presenta bacterias con posibles aplicaciones biotecnológicas que pueden ser aprovechadas en procesos de biorremediación.

De manera similar, Borja y col., (2012) efectuaron un estudio en las aguas termales de Tarapoto en Perú, en el que lograron aislar y caracterizar bacterias halotolerantes productoras de hidrolasas de interés biotecnológico. Los autores seleccionaron en total catorce colonias de diferente tamaño, color y consistencia, luego determinaron sus características morfológicas, fisiológicas y capacidad hidrolítica frente al ween, 80, almidón, gelatina, carboximetilcelulosa y lactosa. El 86% (12/14) de los aislados hidrolizó más de dos sustratos, pero ninguno carboximetilcelulosa; el 93% (13/14) fueron identificados bacilos, crecieron óptimamente entre 30 y 40°C a pH entre 5,0 y 8,0, todos formaron colonias de consistencia gomosa. Los perfiles de hidrólisis indican que al menos existen seis cepas bacterianas productoras de enzimas hidrolíticas con gran potencial industrial.

En España, Valero (2016), estudió de manera comparativa la diversidad microbiana y las principales características físico-químicas en nueve balnearios y trece manantiales de aguas mineromedicinales clasificadas como extremadamente duras, utilizadas en tratamientos terapéuticos y balneoterapia. La mencionada autora encontró que dichos manantiales poseen una gran diversidad microbiana, predominando los bacilos y cocos grampositivos de los Phyla Firmicutes y Actinobacteria y bacilos gramnegativos del Phylum Proteobacteria. Las poblaciones microbianas son predominantemente mesófilas y oligotrofas, que se adaptan

a las condiciones de extrema dureza de las aguas. Las principales actividades metabólicas de las bacterias autóctonas identificadas resultaron proteolíticas, amilolíticas y amonificantes, siendo los géneros más frecuentemente encontrados *Bacillus* (91,7%), *Pseudomonas* y *Staphylococcus* (83%), *Micrococcus* (66,7%) y en menor frecuencia *Cellulomonas* y *Arthrobacter* (50%).

RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN MICROORGANISMOS AISLADOS DE FUENTES TERMALES

El crecimiento desmesurado de las ciudades, aunado a la creciente intervención del hombre sobre su entorno, ha traído como consecuencia que muchas de las fuentes y manantiales naturales de agua termal se hayan contaminado, alterando de esta manera su composición química y microbiológica. El uso indiscriminado de antibióticos en las prácticas médicas, veterinarias y agrícolas resulta en la descarga hacia el ambiente y cuerpos de agua, de antibióticos y bacterias resistentes a antibióticos.

Diversos estudios evidencian que tanto en los ecosistemas animal, humano, terrestre como los acuáticos, existe un reservorio de genes de resistencia antimicrobiana denominado resistoma de antibióticos, cuyo papel en la diseminación y surgimiento de bacterias resistentes y multiresistentes no se ha valorado correctamente (Andueza y col., 2015; Ruíz, 2016).

Se ha señalado el aislamiento de muestras clínicas de cepas como *Pseudomonas aeruginosa* resistentes y multiresistentes a diversos antibióticos. Sin embargo, es escasa la información de aislamiento de este tipo de bacterias en ecosistemas acuáticos como las aguas termales. Guamán (2019), analizó las aguas termales Ojo de Fantasma, ubicadas en el cantón Penipe de la Provincia de Chimborazo, Ecuador. En dicho trabajo de investigación, se realizó el recuento en placas de Petrifilm 3M de bacterias

aerobias mesófilas, coliformes totales y fecales, Mohos y levaduras y presencia *Staphylococcus*, en las muestras de aguas obtenidas de tres piscinas naturales termales. Después de cuatro repiques sucesivos de los aislados obtenidos, logró aislar cuarenta y un clones puros, cuya descripción macroscópica y tinción de Gram reveló la presencia de treinta y tres clones correspondientes a bacilos Gramnegativos (80%) y ocho clones correspondientes a cocos Grampositivos (20%).

La posterior identificación de los clones de dicho estudio mediante pruebas bioquímicas tradicionales permitió diferenciar la presencia de las especies *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Aeromonas schubertii*, *Pseudomonas stutzeri*, *Brevundimonas sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* y *Enterococcus flavescens*.

Los resultados del antibiograma utilizando el método de difusión en disco para cada uno de los clones identificados, demostraron que las especies *P. aeruginosa* y *E. coli* presentan resistencia múltiple frente a los antibióticos ampicilina, amoxicilina-ácido clavulánico, penicilina y cefalotina, mientras que la especie *S. aureus* resultó resistente frente a ampicilina y penicilina.

En dicha investigación se concluye que existe presencia de microbiota patógena y coliformes indicadores de contaminación fecal en las fuentes termales estudiadas, lo que representa un alto riesgo para los usuarios, por lo que es necesario adoptar medidas de protección para mejorar la calidad de estas aguas.

De manera similar, Medina-Ramírez y col., (2017) estudiaron la microbiota bacteriana del agua del Balneario Termas la Merced, ubicado cerca de la Ciudad de Quito, Ecuador, con el fin de identificar las bacterias presentes y determinar sus patrones de resistencia a los antibióticos. Los perfiles de susceptibilidad a antibióticos se realizaron utilizando el método de Kirby Bauer. Los autores identificaron 13 clones bacterianos, correspondientes a las especies *Brevundimonas diminuta*, *Aeromonas*

schubertii, *Budvicia aquatica*, *Acinetobacter haemolyticus*, *Bacillus* spp, *Citrobacter amalonaticus*, *Pseudomonas stutzeri* y *Xenorhabdus beddingii*. Todos los aislados mostraron resistencia al menos a un antibiótico y particularmente las cepas de la especie *Brevundimonas diminuta* mostraron resistencia hasta a cuatro antibióticos. Todos los aislados mostraron resistencia a la Cefalotina, demostrando de esta manera que estas aguas poseen una microbiota bacteriana característica y la presencia de resistomas ambientales.

Por su parte, Jardine y col., (2017) investigaron la diversidad y resistencia antimicrobiana de bacterias patógenas oportunistas cultivables en muestras de agua y sedimento en las fuentes termales de la provincia Limpopo en Sur África. Las cinco fuentes seleccionadas en base a su temperatura y accesibilidad fueron Tshipise, Siloam, Mphephu, Lekkerrus y Libertas, todas excepto Siloam se encuentran en complejos de uso recreacional.

En el mencionado estudio los autores utilizaron el método de filtración por membrana empleando muestras de 100 mL de agua de cada fuente termal y haciéndolas pasar a través de filtros de membrana de 0.22 μ m de diámetro de poro. Seguidamente las membranas fueron cultivadas en 5 medios de cultivo diferentes (agar nutriente, agar aislamiento de actinomicetos, agar mínimo Luria, agar cianobacteria y agar papa dextrosa) y las bacterias aeróbicas aisladas se identificaron por secuenciación de la subunidad 16s de rDNA.

Se ensayó la resistencia de los aislados frente a diez antibióticos a través del método de difusión del disco de Kirby-Bauer, los antimicrobianos ensayados fueron agrupados en seis clases diferentes: lactámicos (carbenicilina), aminoglucósidos (gentamicina, kanamicina, estreptomycin), tetraciclinas, anfenicoles (cloranfenicol, ceftriazona), sulfonamidas (clotrimazol) y quinolonas (ácido nalidíxico, norfloxacin). En las muestras de

agua analizadas lograron aislar especies de patógenos emergentes transmitidos por los alimentos.

Entre las bacterias Grampositivas aisladas se encuentran *Kocuria sp.*, y *Arthrobacter sp.*, mientras que entre las gramnegativas se aislaron las especies *Cupriavidus sp.*, *Ralstonia sp.*, *Cronobacter sp.*, *Tepidimonas sp.*, *Hafnia sp.* y *Sphingomonas sp.* Los clones de *Kocuria*, *Arthrobacter* y *Hafnia*, así como una especie desconocida de Gammaproteobacteria demostraron resistencia frente a dos antibióticos en diferentes combinaciones de carbenicilina, ceftriaxone, ácido nalidíxico y cloranfenicol.,

Los autores concluyeron que las aguas termales son reservorios potenciales de patógenos oportunistas emergentes, incluyendo cepas resistentes a múltiples antibióticos, siendo necesario que los organismos vigilantes de la salud pública adopten medidas de preservación de las fuentes termales, considerando la gran afluencia de pacientes inmunosuprimidos que acuden a visitarlas.

En un trabajo similar, realizacc por Andueza y col., (2015), en aguas termales de Chimborazo, en Ecuador, encontrando cinco cepas de *P. aeruginosa* resistentes a los antibióticos ampicilina, ampicilina-sulbactam, amikacina, ceftazidime, cefepime y ciprofloxacina. En Venezuela, Álvarez (2015), realizó un estudio en muestras de sedimento en los márgenes de las aguas termales conocidas como “Aguas de Moisés” del estado Sucre, en el que se aislaron cepas de bacilos gramnegativos no fermentadores, en las que las cepas de *P.aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y *Stenotrophomonas maltophilia* mostraron un alto porcentaje de sensibilidad a los antimicrobianos probados, excepto dos aislados de *P. aeruginosa* que presentaron resistencia al antibiótico meropenem.

Por su parte, Farías y col., (2015), analizaron la resistencia a metales pesados y antibióticos en cepas aisladas del campo hidrotermal Golpe de Suerte, en el archipiélago de las Azores, localizado en la Cordillera Atlántica Media, Portugal. Los investigadores encontraron resistencias múltiples

fenotípicas en todas las cepas aisladas (35 cepas en total). La secuenciación de los plásmidos recuperados evidenció la presencia de determinantes genéticos de resistencia al cobre, zinc, cadmio, cobalto y cromo, así como a los antibióticos β -lactámicos y fluoroquinolonas sobre un mismo plásmido. Los mencionados autores sugieren la posibilidad de transferencia horizontal de genes y distribución de estas resistencias en la población bacteriana.

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LAS AGUAS DE MANANTIALES MINERALES TERMALES

La importancia de los microorganismos como causantes de enfermedades en los animales y en los humanos ha sido de gran interés para la medicina. En este sentido, las infecciones microbianas siguen siendo hoy en día una causa importante de mortalidad en el mundo, más aún en la población infantil de los países en vías de desarrollo, donde las condiciones económicas, sociales, higiénicas y de salubridad son precarias. Por consiguiente, el agua constituye uno de los principales vehículos mediante el cual se movilizan los microorganismos, siendo una de las principales vías de acceso al ser humano.

En aquellos países donde no existe un adecuado control sanitario de las aguas, las tasas de incidencia y prevalencia de enfermedades de origen hídrico siguen siendo muy altas, lo que hace necesario realizar un control microbiológico de las aguas destinadas al uso humano, con la finalidad de disminuir dichas tasas y evitar los brotes de enfermedades causados por la presencia de microorganismos patógenos. En este contexto, las aguas termales no están exentas de este tipo de control, ya que la mayoría de las personas que acuden a estos sitios, presentan cuadros sintomáticos graves o se encuentran inmunocomprometidos, por lo que debe evitarse el riesgo de

que adquieran alguna infección por patógenos oportunistas presentes en las aguas.

Tales microorganismos oportunistas forman parte de la vasta diversidad microbiana presente en estos ecosistemas acuáticos, de la cual solo se ha investigado hasta el momento una pequeña fracción. Esta diversidad microbiana es una fuente importante de metabolitos primarios, secundarios y enzimas de interés biotecnológico. Sin embargo, los métodos tradicionales de cultivo de microorganismos han limitado el análisis a sólo aquellos que son capaces de crecer en condiciones de laboratorio, es decir viables cultivables, requiriéndose el uso de herramientas de biología molecular para identificar aquellos microorganismos que no son capaces de cultivarse en el laboratorio (Ferrer, 2005 y Rubiano, 2006).

En la actualidad, el estudio de dicha diversidad asociada a la producción de compuestos de interés se encuentra ampliamente extendido, existiendo reportes de las especies microbianas aisladas de fuentes termales en países como Egipto, India, Jordania, Tailandia, y en Latinoamérica en países como Argentina, Colombia, México, Perú y Venezuela entre otros. La riqueza de las aguas termales alrededor del mundo constituye una fuente prometedora de sustancias activas, que nunca antes habían sido consideradas.

De Giglio y col., (2016) estudiaron doscientos siete pozos de aguas termales seleccionados al azar dentro del área monitoreado por la Agencia Regional de Protección Ambiental para uso de emergencia al sur de Italia, entre el mar Adriático y Jonio, evaluando parámetros microbiológicos tales como Coliformes totales, fecales, *Enterococos*, *Pseudomonas*, *Salmonella* entre otros. Los investigadores demostraron que el agua subterránea de sólo 18 de los 207 (8,7%) pozos era potable de acuerdo a los valores de los parámetros ensayados.

Por otra parte, el 56,6% de los pozos estudiados revelaron la presencia de *P. aeruginosa* y 14% de estos evidenciaron además la presencia de *Salmonella* spp. Adicionalmente concluyeron que típicamente, las muestras de agua eran más propensas a ser potables en los períodos de otoño-invierno que en los períodos de primavera-verano. Los mencionados investigadores destacan la importancia de realizar más investigaciones sobre los aspectos microbiológicos de las aguas subterráneas para identificar los riesgos de contaminación fecal y establecer métodos de protección apropiados considerando las características hidrogeológicas y climáticas de cada región.

Thorolfsson y Thor (2013), efectuaron el análisis microbiológico de tres manantiales geotermales utilizados con fines recreativos, localizadas en Lýsuhóll, Hveravellir y Landmannalaugar, en Islandia. Los mencionados autores destacan el hecho de que se trata de fuentes naturales no tratadas, que son visitadas diariamente por gran cantidad de turistas y cuya agua no se utiliza para el consumo humano, pues no son consideradas piscinas públicas. Los resultados del recuento bacteriano por citometría de flujo, recuento en placa a 22°C, 37°C y 50°C para evidenciar la presencia de Enterobacterias, la utilización de medios selectivos para el aislamiento de *Pseudomonas* y el uso de PCR para la identificación de los principales grupos bacterianos en las fuentes estudiadas, evidenciaron una mayor contaminación fecal debido al aislamiento de *Enterococcus* sp. y *E. coli*, en las piscinas geotérmicas donde el flujo de agua era bajo y el número de huéspedes de baño era alto durante el día.

Asimismo, dichos autores encontraron un elevado número de *Pseudomonas* (13.000-40.000 UFC/mL) en las fuentes estudiadas, algunas de las cuales fueron clasificadas como patógenos oportunistas para el ser humano, tal como *P. aeruginosa*. Además de esto, la secuenciación parcial del gen 16S rRNA reveló la presencia de diferentes comunidades microbianas en las piscinas, compuestas principalmente por alfa, beta y

gamma-proteobacteria. Los investigadores concluyen acerca del riesgo potencial que representan estas fuentes termales para los usuarios debido a la presencia de microorganismos potencialmente patógenos.

En Jordania, Obeidat y col., (2012) aislaron e identificaron ocho cepas de bacterias termófilas pertenecientes al género *Geobacillus*, las cuales mostraron actividad enzimática prometedora puesto que resultaron productoras de amilasa, caseinasa, fosfatasa ácida y alcalina, esterasa, α -galactosidasa, β -glucosidasa entre otras enzimas de interés biotecnológico. Por su parte, en la India se han efectuado gran cantidad de investigaciones sobre el tema, una de estas fue realizada por Mukherjee y col., (2012) quienes identificaron el metabolito secundario azul-verdoso producido por la especie *Pseudomonas aeruginosa* GIM 32, aislada de las aguas termales de Bakreshwar. Dicho metabolito, resultó un inhibidor del crecimiento de bacterias gramnegativas.

En otro estudio realizado por Saikia y col., (2012), específicamente en las aguas termales de Assam en la India, se logró aislar la cepa bacteriana BPM3 del lodo del manantial. Esta cepa demostró ser un potente inhibidor del crecimiento de hongos patógenos para las especies vegetales, tales como *Fusarium* spp., *Magnaporthe grisea* sp. y *Rhizoctonia oryzae*. También demostró actividad contra bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus*.

Por otra parte, Pallavi y col., (2011), realizaron un estudio en las aguas termales de Maharashtra en la India, en el que lograron aislar cepas bacterianas y de Actinomycetos con actividad antimicrobiana. De manera similar, Bredholdt y col., (2007) efectuaron un estudio en los sedimentos de aguas poco profundas de Trondheim en Noruega, aislando un total de treinta y cinco cepas de actinomycetos que fueron clasificados dentro de once géneros de acuerdo a los resultados de la secuenciación de su genoma. Dichos microorganismos fueron sometidos a bioensayos contra la bacteria

Gram positiva *Micrococcus luteus* y la levadura *Candida albicans*, resultando activos contra ambas especies nueve de las treinta y cinco cepas aisladas.

En el ámbito latinoamericano, también se han efectuado trabajos de investigación en manantiales termales, orientados sobre todo a la búsqueda de metabolitos bioactivos. Tal es el caso de un trabajo de investigación realizado por Shell y col., (2011) quienes lograron separar la fase líquida a partir del lodo de las aguas termales de Copahue en Argentina, ensayando su actividad contra cepas de *Staphylococcus aureus* provenientes de piel y mucosas de pacientes hospitalizados en la región.

De manera similar, Navas y col., (2010), realizaron un trabajo de investigación en las aguas termales de la Provincia de Salta, en Argentina, y lograron identificar las cepas bacterianas termófilas aisladas como pertenecientes a los géneros *Thermus* y *Geobacillus*. A las cepas bacterianas identificadas como *Thermus* sp. se les extrajo el ADN y se realizó su posterior secuenciación con la finalidad de encontrar posibles genes responsables de la degradación de sustratos, tales como xilanasas, proteasas, esterases, lipasas, catalasas y galactosidasas entre otras.

Avendaño (2016), estudió la calidad microbiológica de las aguas termales de la estación “Los Volcanes”, en Colombia, efectuando una comparación entre diferentes normativas de calidad de aguas termales. Según el mencionado autor, la normativa española establece la ausencia en 1g o por cada 100 mL de: *coliformes totales*, *Escherichia coli*, *Streptococcus fecales*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*. En cuanto a los recuentos de bacterias aerobias y *Legionella pneumophila*, la autoridad sanitaria determinará las directrices a seguir.

Por otra parte, la normativa Chilena en cuanto al uso de balnearios con fines recreativos establece un límite de bacterias aeróbicas ≤ 200 colonias/mL, ausencia de coliformes fecales y los coliformes totales deben cumplir con el límite ≤ 20 colonias / 100 mL. De manera similar, en Cuba

existe una normativa referente a las aguas para baño la cual establece que los microorganismos heterótrofos deben estar entre 100-10.000 UFC/mL, los coliformes totales, *Streptococos fecales* y *Pseudomonas aeruginosa* <2.2 NMP/100 mL.

El mencionado autor, resalta el hecho de que la Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció un documento denominado Directrices para Ambientes de Aguas Recreacionales Seguras, Volumen 2, referente a piscinas y ambientes similares, en el que hace referencia a los siguientes límites microbiológicos para balnearios naturales: Coliformes termotolerantes < 1 UFC/ 100 mL, *Pseudomonas aeruginosa* <10 UFC/100 mL y *Legionella* sp. < 1 UFC/ 100 mL.

En Estados Unidos, la Agencia de Protección Ambiental (EPA) ha establecido una serie de criterios microbiológicos para aguas dulces recreacionales, tales como el contenido de *E. coli* \leq 126 UFC/ 100 mL y Enterococos \leq 33 UFC/ 100 mL. En Colombia, no se ha redactado hasta el momento la normativa de calidad para aguas termales, sin embargo, existe un proyecto de dicha norma el cual establece como límite máximo para coliformes totales 1000 NMP/100 mL y coliformes fecales <200 NMP/100 mL.

En este particular, Avendaño (2016), enfatiza que la variabilidad en los estándares microbiológicos para aguas de recreación, obligan a la realización de estudios de vigilancia epidemiológica acerca de la incidencia de enfermedades y brotes de infecciones relacionados con el uso de fuentes termales, para de este modo, establecer de manera certera los criterios de control sanitario para las fuentes termales.

Por su parte, Posada y col., (2004) llevaron a cabo una investigación en las aguas del manantial mineral de Paipa, en Boyacá, Colombia, logrando aislar ocho cepas bacterianas termófilas denominadas consecutivamente desde P4-6, hasta P4-13. Estas cepas demostraron su capacidad de producir etanol y acetato como principales productos de fermentación, razón por la

cual podrían ser aprovechadas en la industria para la obtención de tales metabolitos.

Guallpa (2016), identificó la microbiota autóctona y alóctona presente en las aguas termales del Balneario “Cununyacu”, ubicado en la Provincia de Pichincha, Ecuador, logrando aislar 180 clones, de los cuales 52% fueron cocos positivos y 43 % bacilos negativos, del total de clones aislados, 22 fueron identificados mediante el empleo de diversas pruebas bioquímicas, las como pertenecientes a las especies *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus viridans*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus spp.*, *Bacillus spp*, *Alcaligenes faecalis*, *Brevundimonas diminuta*, *Aeromonas schubertii*, evidenciándose la biodiversidad existente en la fuente termal estudiada.

Particularmente en Venezuela, existen pocos estudios acerca de la biodiversidad de las especies microbianas presentes en las distintas aguas termales del país. La mayoría de los trabajos existentes en la literatura corresponden al análisis de la composición fisicoquímica de las aguas y búsqueda de metabolitos bioactivos, concediendo poca importancia a la caracterización de la población microbiana autóctona de cada fuente de agua estudiada.

Entre los estudios relacionados que se han efectuado, se encuentra el trabajo de investigación realizado por Alarcón y Correa (2009), quienes analizaron la microbiota de los manantiales termales de Aguas Calientes en el estado Táchira, encontrando que la microbiota bacteriana presente en dicho ecosistema corresponde en su mayoría a bacilos Gram negativos. En este estudio se aislaron tres cepas bacterianas termófilas denominadas C30, C35 y C36, cuya capacidad de degradar azufre fue demostrada por su crecimiento en medios de cultivo suplementados con dicho elemento. Por su parte, Cuellar y col., (2007) efectuaron un estudio en los manantiales termales localizados en el municipio Ayacucho del estado Táchira, en el que aislaron y

caracterizaron cepas de microorganismos termófilos, de los cuales resultaron dieciocho cepas bacterianas, dos cepas de mohos y cinco estructuras semejantes a actinomycetos.

Valbuena y col., (2010) efectuaron un estudio sobre la actividad sulforeductora y desulfurizadora en bacterias termófilas aisladas de lodos hidrotermales de Las Trincheras en el estado Carabobo, Venezuela. Para ello, las poblaciones bacterianas aisladas, fueron incubadas en medios químicamente definidos usando hexano, heptano y dibenzotiofeno (DBT) como fuentes de carbono, demostrándose que bajo condiciones de anaerobiosis, los aislados efectuaron reacciones de sulforeducción. La actividad detectada en un amplio intervalo de temperaturas (42-75)°C fue estimulada por la incorporación de lactato al medio. Una de las cepas aisladas (RD) de bacilos grampositivos, utilizó DBT como fuente de carbono y azufre en cultivos anaeróbicos a 55°C.

Los mencionados autores evidenciaron que la degradación de DBT, evaluada por cromatografía de gases sin y con espectrometría de masa, fue también efectuada por el medio de cultivo libre de células (FLC), previamente utilizado por la cepa, indicando que el sistema enzimático degradador de DBT puede funcionar extracelularmente y es probablemente excretado al medio de cultivo durante el crecimiento bacteriano, lo que resulta de interés industrial ya que uno de los procesos de mayor relevancia y que resulta más costoso en la refinación del petróleo es la eliminación del azufre.

Entre los trabajos relacionados a las características fisicoquímicas de las fuentes termales se encuentra el realizado por Benítez y col., (2015), quienes efectuaron un estudio para evaluar la calidad fisicoquímica e isotópica de diez fuentes termales del municipio libertador del estado Sucre, en Venezuela. En las fuentes seleccionadas, las temperaturas estuvieron comprendidas entre 33,7 y 57,5°C, considerándose que en las zonas se encuentran fuentes con características hipotermas, mesotermas e

hipertermales. Los valores de pH oscilaron entre 6,07 y 6,49; indicando que se trataba de fuentes ligeramente ácidas, con valores de conductividad (9,36-14,16 mS/cm) y de sólidos totales disueltos (3,14-4,06 g/L), que las identifican como aguas con una apreciable mineralización y sólidos disueltos. Entre los iones mayoritarios encontrados por los autores en dichas fuentes predominó la presencia de Na⁺ (hasta 2,9658 g/L) y Cl⁻ (hasta 1,9766 g/L), por consiguiente, dichas fuentes se clasificaron como cloruradas sódicas.

CALIDAD SANITARIA DEL AGUA

El agua es esencial para la vida, pero muchas personas no tienen acceso a agua de consumo limpia y segura desde el punto de vista sanitario inclusive anualmente mueren gran cantidad de individuos por infecciones bacterianas transmitidas por el consumo de agua no potable. Entre las principales enfermedades bacterianas transmitidas por el agua se encuentran el cólera, la fiebre tifoidea y la disentería bacilar, asimismo existen algunas cepas patogénicas de *Escherichia coli* y otros patógenos emergentes causantes de enfermedades.

En Europa y Norteamérica, el suministro constante de agua limpia y tratada es la norma en cada casa, pero en países en desarrollo, el acceso a agua limpia y la sanitización no son la regla, siendo comunes las infecciones transmitidas por el agua. Dos billones y medio de personas no tienen acceso a servicios sanitarios y por encima de un millón y medio de niños mueren cada año como consecuencia de enfermedades diarreicas. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) la mortalidad asociada a enfermedades transmitidas por el agua excede los cinco millones de personas al año. De estas muertes, más del 50% son causadas por infecciones intestinales microbianas, siendo el cólera la infección que ocupa el primer lugar en la lista (Cabral, 2010).

En términos generales, los mayores riesgos microbiológicos se asocian con la ingestión de agua contaminada con heces humanas o animales. La descarga de aguas residuales en aguas dulces y aguas costeras constituyen la principal fuente de microorganismos fecales, incluyendo patógenos. En este contexto, las enfermedades diarreicas agudas son uno de los principales problemas de salud pública en los países en desarrollo. Generalmente las personas afectadas por enfermedades diarreicas son aquellas con los recursos financieros más bajos y las más pobres facilidades higiénicas. En países de Asia y África, los niños menores de cinco años son los más afectados por las enfermedades microbianas transmitidas por el agua (Cabral, 2010).

No obstante, las enfermedades microbianas transmitidas por el consumo de agua también afectan a los países desarrollados. En los Estados Unidos se ha estimado que cada año, aproximadamente 560.000 personas sufren de enfermedades severas por esta causa y 7.1 millones de personas padecen infecciones leves a moderadas, resultando en un estimado de 12.000 muertes anuales. En la siguiente tabla se resumen las enfermedades bacterianas más importantes transmitidas por el agua.

Tabla 9.-Principales enfermedades bacterianas transmitidas por el consumo de agua

Enfermedad	Agente causal
Cólera	<i>Vibrio cholerae</i> , serovariedades O1 y O139
Gastroenteritis causada por Vibrios	Principalmente <i>Vibrio parahaemolyticus</i>
Fiebre tifoidea y otras Salmonelosis severas	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Paratiphy</i> <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Tiphy</i> <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Tiphymurium</i>
Disentería bacilar o shigelosis	<i>Shigella dysenteriae</i> <i>Shigella flexneri</i> <i>Shigella boydii</i> <i>Shigella sonnei</i>
Diarreas agudas y gastroenteritis	<i>Escherichia coli</i> , particularmente los serotipos O148, O157 y O124

Fuente: Cabral (2010).

www.bdigital.ula.ve

Finalmente, podría afirmarse que el “agua segura para todos” debe ser una de las principales metas del siglo XXI y que el control microbiológico del agua debe ser la regla en todos los países del mundo. El análisis microbiológico rutinario básico del agua de bebida debe ser llevado a cabo ensayando la presencia de *Escherichia coli* por métodos de cultivo. Cada vez que los recursos económicos estén disponibles, se debe complementar la determinación de coliformes fecales con la determinación de enterococos. Mejorar el acceso a agua segura para la bebida puede resultar en beneficios significativos para la salud. Es necesario realizar un mayor esfuerzo para mejorar la calidad del agua de bebida tanto como sea posible.

FUENTES TERMALES DEL ESTADO MÉRIDA

Respecto al ámbito local, tal como se mencionó anteriormente, el Estado Mérida posee una de las mayores riquezas hidrológicas de Venezuela, representada en buena parte por la gran cantidad de fuentes termales que se localizan a lo largo de su geografía (Figura 3), cuyo drenaje se inicia desde los páramos ubicados en la zona andina hacia las llanuras o depresiones (zona del lago de Maracaibo o Barinas).

Las fuentes termales se sitúan en las proximidades de los ríos Chama, Capaz, Mucujún, Albarregas, Escalante, Uribante entre otros, en dirección noroeste. Algunas de las fuentes termales más conocidas del estado Mérida son las fuentes de: Aguas Calientes de Ejido, Mucuchíes, Tabay, Chama, Jají, Piñago, Caño Zancudo, Zea, Chiguará, Santa María de Caparo, Santa Apolonia, Bailadores, Quebrada Sucia, Los Giros, La Carbonera, Canaguá y La Culata (Burguera y col., 1983).

En sentido Noreste a Sureste, de acuerdo a su orden geográfico natural a lo largo de la carretera trasandina se encuentran las siguientes fuentes termales: Mucuchíes, Tabay, La Culata, Chama, Ejido, Jají, Chiguará, Bailadores. Para Martínez (1970), la gran cantidad de fuentes termales que alberga el Estado Mérida, poseen gran belleza e inclusive hace mención al hecho de que los historiadores como Gabriel Febres Cordero relatan que tales fuentes eran utilizadas por los aborígenes con fines medicinales antes de la colonia.

OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

Objetivo General

Analizar el perfil bacteriano y potencial biotecnológico de las especies presentes en las fuentes termales La Musuy del municipio Rangel en el estado Mérida.

Objetivos Específicos

Determinar la presencia de bacterias heterótrofas viables cultivables en las fuentes termales mediante el aislamiento en medios de cultivo.

Identificar los géneros y especies bacterianas aisladas de las fuentes termales mediante pruebas bioquímicas de referencia y el sistema de galerías API®.

Reconocer la presencia de bacterias potencialmente patógenas en las muestras de aguas analizadas utilizando medios de cultivo selectivos.

Establecer el valor de los indicadores de calidad sanitaria, coliformes totales, coliformes fecales, mohos y levaduras en las aguas termales de La Musuy a través del recuento en placa.

Evaluar el perfil de resistencia antimicrobiana de cada una de las especies identificadas utilizando el método de Kirby-Bauer.

Detectar la presencia de microorganismos con posibles actividades biológicas de interés en biotecnología y la variación de su composición durante un año mediante ensayo en medios de cultivo específicos.

CAPITULO II

METODOLOGÍA

Población y Muestra

La población de estudio estuvo conformada por los microorganismos heterótrofos viables cultivables que habitan en las aguas termales ubicadas en La Musuy, estado Mérida, Venezuela. La muestra estuvo representada por los microorganismos presentes en el volumen de agua recolectado y que lograron cultivarse en condiciones experimentales.

1. Identificación y selección de los sitios de muestreo

Los sitios de muestreo seleccionados fueron georeferenciados utilizando un GPS Oregon 550, con la finalidad de obtener las coordenadas geográficas precisas del lugar de recolección, así como los datos de altitud (m.s.n.m) y presión atmosférica (mmHg). Adicionalmente, al momento de cada muestreo se realizó un registro de las principales condiciones bioclimáticas de las localidades muestreadas, efectuando mediciones de la temperatura del agua (°C), pH, temperatura ambiental (°C) y humedad relativa (%HR) por medio de un termohigrómetro.

1.1 Ubicación geográfica de las aguas termales La Musuy

Las aguas termales de La Musuy se localizan al oeste de Mucuchíes, municipio Rangel del estado Mérida, específicamente en el lado norte de la carretera Trasandina. Para acceder a estos manantiales termales desde la ciudad de Mérida es necesario trasladarse en vehículo en dirección al

páramo, específicamente al pueblo de Mucuchíes, ubicado a unos 54 Km de la ciudad y en las cercanías a la entrada del poblado se encuentra un aviso informativo que indica “La Musuy”, desde donde es posible continuar caminando aproximadamente durante una hora hacia el sitio donde se encuentran los manantiales.

2. Recolección de las muestras

2.1 Características geográficas y fisicoquímicas de La Musuy

Antes de proceder a la colecta de las muestras de agua termal, se registraron las características de la vegetación predominante en el sitio y se hicieron mediciones de la temperatura y pH del agua del manantial termal en el que se efectuó la recolección. Para medir la temperatura se sumergió un termómetro de mercurio en un área específica del cuerpo de agua, de manera similar, para determinar el pH se tomó una muestra de agua en un recipiente en el cual se introdujo un pHmetro portátil.

2.2 Toma de las muestras de agua termal

Para efectuar la recolección de las muestras de agua termal se utilizaron envases de vidrio con tapa estériles y debidamente rotulados con los datos de la localidad y del punto específico de muestreo, procurando efectuar la extracción del agua de manera aséptica, utilizando guantes y realizando el procedimiento lo más rápido posible para evitar mantener el frasco destapado. En cada punto de muestreo seleccionado se tomaron muestras por triplicado de un volumen de 2 L de agua termal para cada muestra. Una vez efectuada la recolección, las muestras fueron cuidadosamente trasladadas en cavas a temperatura ambiente y en oscuridad hasta el laboratorio para efectuar los análisis el mismo día de la toma.

Es necesario resaltar que en el área en el que se encuentran ubicadas las aguas termales de La Musuy, se encuentran dos pozos, separados entre sí por aproximadamente 3 metros de distancia. Un pozo superior ubicado a mayor altura de la formación rocosa, el cual cuenta con su propia naciente y comprende un área aproximada de 1 m², se accede por el lateral derecho, el cual se encuentra bordeado de herbáceas y pequeños arbustos, mientras que por el lateral izquierdo está flanqueado por una roca de gran tamaño, a modo de pared montañosa. Seguidamente, a menor altitud se encuentra otro pozo o pozo inferior, de mayor superficie (aproximadamente 5 m²), el cual es el de mayor afluencia por los visitantes, debido a que resulta de más fácil acceso inclusive desde ambos laterales ya que no está flanqueado en su totalidad por la montaña rocosa como el pozo superior.

Para realizar la presente investigación se utilizó un muestreo no probabilístico a conveniencia; para ello se seleccionó el pozo superior, debido a que este es el menos intervenido por el hombre, motivado a la dificultad para su acceso. En total se realizaron cinco muestreos entre el año 2016 y 2017, según se refleja en la Tabla 10. En el primer muestreo realizado se seleccionaron cuatro puntos en el pozo superior, los cuales se identificaron visualmente con una marca para repetir los muestreos en los meses sucesivos. Los códigos asignados a estos puntos fueron: Naciente del pozo superior muestra 1 (NM1), Pozo superior muestra 1 (PM1), Naciente del pozo superior muestra 2 (NM2), Pozo superior muestra 2 (PM2).

Los muestreos se realizaron por duplicado en cada punto seleccionado, entre las 08:00-09:00 am por ser una de las horas del día en las que existe menos afluencia de bañistas al sitio y para garantizar el pronto retorno a la ciudad de Mérida, a fin de efectuar el procesamiento de las muestras de agua.

Tabla 10.- Fechas en las que se realizaron los muestreos de aguas termales La Musuy durante el período 2016-2017

Meses	Septiembre 2016	Diciembre 2016	Abril 2017	Junio 2017	Septiembre 2017
Fecha	03/09/2016	02/12/2016	07/04/2017	03/06/2017	02/09/2017

Fuente: Gutiérrez (2019).

3. Determinación de bacterias aerobias heterótrofas viables

El aislamiento de las bacterias heterótrofas viables cultivables provenientes de las muestras de aguas termales recolectadas se realizó por la técnica de filtración en membrana y por la técnica de dilución en placa, utilizando como medios de cultivo: Agar Plate Count (Himedia, India), Agar R2A (Himedia, India) y placas de Petrifilm 3M[®] para recuento de Aerobios.

Los medios de cultivo se prepararon según las instrucciones del fabricante pesando las cantidades indicadas y disolviendo con agitación en agua destilada (ver composición de los medios en las Tablas 11 y 12). Posterior a su preparación los medios fueron autoclavados a 121°C por 15 minutos, ajustando el pH según indicaciones del fabricante. Seguidamente se dejaron reposar hasta alcanzar una temperatura aproximada de 45°C y se dosificaron en placas de Petri y tubos estériles. Las placas de Petrifilm 3M[®] se usaron directamente como las suministra el fabricante.

Tabla 11.- Composición del agar Plate Count

Ingrediente	g/L
Caseína hidrolizado enzimático	5
Extracto de Levadura	2.5
Dextrosa	1
Agar	9
pH después de esterilizar	7.0±0.2

Fuente: HIMEDIA Technical Data M091A

Tabla 12.- Composición del agar R2A

Ingrediente	g/L
Extracto de levadura	0.50
Peptona	0.50
Casaminoácidos	0.50
Glucosa	0.50
Almidón	0.50
Piruvato sódico	0.30
Fosfato dipotásico	0.30
Sulfato ácido magnésico heptahidratado	0.05
Agar	15
pH después de esterilizar	7.2±0.2

Fuente: HIMEDIA Technical Data MM1743

Para efectuar la técnica de filtración por membrana se utilizó un filtro de 0.22 μ de diámetro de poro y el volumen de muestra de agua termal utilizado fue de 50 mL, mientras que para la técnica de dilución en placa se usaron volúmenes de 1 mL para siembra en placas de petrifilm y 0.1 mL en el

caso de la siembra por extensión de superficie.

Cada muestra fue sembrada por duplicado en los medios de cultivo descritos anteriormente y en placas de Petrifilm 3M[®] para recuento de aerobios y se incubaron a dos temperaturas: Temperatura ambiente (aproximadamente a 25 °C) durante 5 días y a la temperatura de 37°C en estufa (Memmert, Alemania) durante 48 horas. En la técnica de filtración por membrana, luego de realizar la filtración al vacío de las muestras de agua termal, los filtros se retiraron cuidadosamente del sistema de filtración mediante el uso de pinzas estériles y se depositaron sobre las placas conteniendo los medios de cultivo.

Finalizado el tiempo de incubación, se realizó el conteo de las colonias obtenidas y los resultados fueron expresados como el promedio aritmético de las unidades formadoras de colonia por mililitro de muestra (UFC/mL). Seguidamente, las colonias más representativas y que presentaran diferente morfología se resembraron en placas de Agar BHI (Himedia, India) con la finalidad de obtener colonias aisladas por agotamiento y realizar su posterior identificación (ver composición del agar en Tabla 13). Las cepas aisladas se conservaron en tubos de Agar nutritivo (Himedia, India) mantenidos a temperatura ambiente (APHA, 2005).

Tabla 13.- Composición del agar BHI

Ingrediente	g/L
Polvo infusión HM	12.5
Polvo BHI	5
Peptona proteasa	10
Dextrosa	2
Cloruro de sodio	5
Fosfato disódico	2.5
Agar	15
pH después de esterilizar	7.4±0.2

Fuente: HIMEDIA Technical Data M211

4. Identificación microbiológica de las bacterias aisladas

Inicialmente la identificación microbiológica de las cepas aisladas se realizó por pruebas convencionales (Barrow y Feltham, 2003; Forbes y col., 2004; MacFaddin, 2004; Ramírez, 2006), y fue confirmada mediante galerías API[®]20E (Biomerux, Francia) para bacilos gramnegativos fermentadores (BGNF), y galerías API[®] 20NE para bacilos gramnegativos no fermentadores (BGNNF) según las instrucciones del fabricante. Los fundamentos de identificación de las pruebas bioquímicas se describen a continuación:

4.1 Identificación de bacterias heterótrofas viables cultivables

4.1.1 Tinción de Gram:

Es una técnica de tinción diferencial propuesta por el científico Christian Gram, la cual permite diferenciar bacterias grampositivas y gramnegativas en base a la coloración que adquiere la pared celular luego de una serie de procesamientos con sustancias químicas (Ramírez, 2006). Para efectuar la

tinción se utilizó un cultivo de 24 horas a 30°C en Agar TSA (ver composición en Tabla 14).

Tabla 14.- Composición del agar TSA

Ingrediente	g/L
Digerido pancreático de caseína	17
Digerido papaínico de carne de soya	3
Cloruro de sodio	5
Dextrosa (Glucosa)	2.5
Fosfato de hidrógeno dipotásico	2.5
Agar	15
pH después de esterilizar	7.3±0.2

Fuente: HIMEDIA Technical Data M1968

Se tomó con un asa una pequeña porción del aislado a identificar y se depositó sobre la superficie de un portaobjeto limpio al que previamente se le añadió una gota de agua destilada estéril. Se realizó un frotis uniforme a lo largo del portaobjeto y se fijó la muestra con calor haciéndola pasar rápidamente por un mechero.

Posteriormente se añadió una gota del colorante violeta de gencianasobre el portaobjetos y se dejó reposar durante un minuto. Este colorante puede atravesar cualquier tipo de pared bacteriana por lo que tiñe tanto bacterias grampositivas como gramnegativas. Luego se enjuagó la muestra con agua corriente y se añadió una solución de lugol, de manera que cubriera toda la muestra. Se dejó reposar durante un minuto.

La solución de Lugol está formada principalmente por yodo, cuya finalidad es fijar el colorante violeta de genciana a la muestra mediante la formación de un complejo insoluble en agua capaz de penetrar en la pared

de las células bacterianas. Seguidamente, el portaobjetos se lavó con una mezcla de alcohol y acetona durante 30 segundos, la cual disuelve los complejos de lugol y violeta de genciana. Posteriormente se añadió el colorante safranina dejándolo reposar durante un minuto y se lavó con agua corriente. Se dejó secar la lámina portaobjetos y se examinó bajo el microscopio tanto la morfología como la coloración.

Las bacterias grampositivas se tiñen de morado debido a que retienen el colorante en su pared celular, mientras que las gramnegativas adquieren una coloración rojo rosado (Barrow y Feltham, 2003; MacFaddin, 2004).

4.1.2 Prueba de oxidasa:

Esta prueba consiste en la detección de la enzima transportadora de electrones citocromo oxidasa, responsable de la transferencia de estas partículas cargadas hacia el aceptor final (oxígeno) en la respiración aerobia.

Para efectuar la prueba se tomó con un paño estéril una muestra del aislado proveniente de un cultivo de 24 horas en agar TSA y se extendió en una tira de papel impregnada en solución acuosa al 1% de tetrametil-p-fenilendiamina, la cual en presencia de oxígeno y de la enzima citocromo oxidasa produce una coloración azul oscuro, indicando la positividad de la reacción. Por lo tanto, al observar la aparición de dicha coloración transcurridos 30 segundos, se consideraba que el microorganismo es positivo para la producción de oxidasa (Barrow y Feltham, 2003; MacFaddin, 2004).

4.1.3 Prueba de catalasa:

Se fundamenta en la detección de la enzima catalasa, responsable de descomponer el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. Para realizarla se tomó con un asa la colonia a ensayar (proveniente de un cultivo de 24 horas en agar TSA) y se emulsionó con una gota de solución de peróxido de hidrógeno al 10 %v/v sobre la superficie de un portaobjetos. Se considera

positiva la producción de la enzima cuando se observa desprendimiento de oxígeno en forma de burbujeo (Forbes y col., 2004; MacFaddin, 2004).

4.1.4 Prueba del tipo de respiración:

Se realiza utilizando el medio tioglicolato semifluido (ver composición del medio en Tabla 15) al cual se le elimina el oxígeno por ebullición. Este medio de cultivo es adecuado para recuperar bacterias aeróbicas facultativas, anaerobias estrictas y microaerófilas poco exigentes, ya que en su composición se utiliza una baja cantidad de agar, lo que genera un bajo potencial de óxido-reducción ya que limita la entrada de oxígeno, y va disminuyendo aún más a medida que se profundiza hacia el interior del tubo.

Para efectuar la prueba se tomó una porción del microorganismo a ensayar y se sembró en el medio, incubando a 30°C durante 48 horas. Finalizado el tiempo de incubación, la presencia de microorganismos se evidencia con la aparición de turbidez en el medio.

www.bdigital.ula.ve

Tabla 15.- Composición del medio fluido tioglicolato

Ingrediente	g/L
L-cistina	0.5 g
Cloruro de sodio	2.5 g
Glucosa	5.5 g
Extracto de Levadura	5 g
Triptona	15 g
Tioglicolato de sodio	0.5 g
Resazurina sódica al 0.1%	1 mL
Agar	0.75 g
pH después de esterilizar	7.1±0.2

Fuente: Merck Millipore Technical Data 108191

4.1.5 Prueba de Oxidación - Fermentación de Glucosa (Hugh y Leifson):

Esta prueba evidencia el tipo de metabolismo por el que los microorganismos fermentan la glucosa (vía oxidativa o fermentativa) y se visualiza mediante el cambio de color de un indicador presente en el medio de Hugh-Leifson (ver composición del medio en Tabla 16) debido a la presencia de ácidos resultantes del metabolismo microbiano.

Aquellos microorganismos capaces de oxidar la glucosa, en presencia de oxígeno producen ácidos que ocasionan el cambio de color del medio originalmente verde a color amarillo, mientras que los microorganismos que fermentan la glucosa ocasionan este mismo cambio de color en ausencia de oxígeno. En aquellos casos donde no ocurre cambio del indicador en ninguno de los tubos se considera que el microorganismo es inerte (Forbes y col., 2004; MacFaddin, 2004).

Tabla 16.- Composición del medio de Hugh-Leifson

Ingrediente	g/L
Triptona	2
Cloruro de sodio	5
Fosfato dipotásico	0.3
Agar	3
pH después de esterilizar	7.1±0.2

Fuente: HIMEDIA Technical Data M826S

Para ejecutar la prueba se tomó una porción del aislado a ensayar (proveniente de un cultivo de 24 horas en agar TSA) y se sembró por punción en dos tubos conteniendo el medio de Hugh y Leifson. Uno de los tubos se selló con parafina estéril para generar condiciones de anaerobiosis

y evidenciar de este modo la fermentación. Ambos tubos se incubaron a 30°C durante 72 horas y se examinaron al final de la incubación.

4.1.6 Prueba de Motilidad:

Esta prueba tiene como finalidad ensayar la capacidad de desplazamiento de un microorganismo en un medio de cultivo semisólido. Los microorganismos móviles crecen de manera difusa sobrepasando la línea de inoculación, mientras que los inmóviles sólo pueden crecer en la línea de inoculación (Barrow y Feltham, 2003).

Para realizar la prueba se hizo una siembra por punción del aislado a ensayar en un tubo de agar movilidad a aproximadamente 1,5 cm de profundidad y se incubó a 30°C durante 48 horas. Finalizado el tiempo de incubación se examinó si el microorganismo fue capaz de crecer sobrepasando la línea de inoculación

4.2 Identificación de bacilos gramnegativos fermentadores (BGNF)

A las cepas bacterianas aisladas de las fuentes termales La Musuy, previamente caracterizadas como bacilos gramnegativos fermentadores (BGNF), se les realizaron adicionalmente las principales pruebas bioquímicas establecidas para la identificación esta clase de microorganismos a nivel de género y especie. Posteriormente, se confirmaron mediante el uso de galerías de identificación API[®]20E (Biomerux, Francia). Las pruebas de identificación realizadas se describen a continuación:

4.2.1 Fermentación de la Lactosa y producción de gas

Esta prueba permite visualizar la fermentación de la lactosa utilizando un medio base que contiene el carbohidrato y el indicador rojo de fenol. La producción de gas se evidencia introduciendo una campana de Durham en el

medio de cultivo líquido, con la finalidad de visualizar si ocurre desplazamiento de líquido en el interior de la campana (Ramírez, 2006).

Para realizar la prueba se tomó con un asa una porción de la cepa a ensayar y se inoculó en un tubo con caldo lactosado (ver composición en tabla 17) conteniendo la campana de Durham y el indicador rojo de fenol. Se incubaron las muestras a 37°C durante 24 a 48 horas, considerándose positivas para fermentación de lactosa las muestras en las que ocurre un cambio del indicador rojo de fenol a color amarillo y la producción de gas es positiva cuando hay desplazamiento de líquido en el interior de la campana.

Tabla 17.- Composición del caldo lactosado

Ingrediente	g/L
Extracto de carne	3
Peptona	5
Lactosa	5
pH después de esterilizar	6.7±0.2

Fuente: HIMEDIA Technical Data M1003

4.2.2 Reacción en Agar Kliger (KIA):

La siembra en agar kliger (ver composición en tabla 18) permite demostrar la capacidad de un microorganismo para fermentar los carbohidratos glucosa y lactosa, la producción de ácido sulfhídrico (H₂S) y gas. La fermentación de carbohidratos se evidencia por el viraje del indicador rojo de fenol presente en el medio, de color rojo a color amarillo. Si este cambio de coloración se produce en el fondo del tubo es indicativo de positividad para la fermentación de la glucosa, mientras que si el cambio de color ocurre tanto en el fondo como en la superficie del medio, es señal de que el microorganismo es capaz de fermentar ambos carbohidratos, glucosa y lactosa.

Tabla 18.- Composición del agar Kliger

Ingrediente	g/L
Extracto de carne	3
Extracto de levadura	3
Peptona péptica	15
Proteosa peptona	5
Lactosa	10
Glucosa	10
Sulfato ferroso	0.20
Cloruro de sodio	5
Tiosulfato de sodio	0.30
Lactosa	5
Agar	12
Rojo de fenol	24
pH después de esterilizar	7±0.2

Fuente: HIMEDIA Technical Data M078A

La aparición de un precipitado de color negro en el medio refleja la formación de H₂S debido a la reducción del hierro presente en el medio, mientras que la presencia de burbujas es señal positiva de la formación de gas como resultado de la fermentación (Barrow y Feltham, 2003).

Para realizar esta prueba se hizo una siembra por punción y en estría de la cepa a estudiar en un tubo de agar Kliger y se incubó a 30°C durante 24 horas. Finalizado el tiempo de incubación se examinaron los cambios ocurridos en el medio.

4.2.3 Uso del Citrato de Simmons:

Esta prueba evidencia el uso del citrato por los microorganismos como única fuente de carbono para su crecimiento. Se realiza utilizando el medio

citrato de Simmons (ver composición en Tabla 19), que contiene citrato de sodio como fuente de carbono y fosfato de amonio como fuente de nitrógeno.

Tabla 19.- Composición del agar citrato de Simmons

Ingrediente	g/L
Sulfato de magnesio	0.20
Fosfato de amonio	1
Fosfato de potasio	1
Citrato de sodio	1
Cloruro de sodio	5
Azul de bromotimol	0.08
Agar	15
pH después de esterilizar	6.8±0.2

Fuente: HIMEDIA Technical Data M099

www.bdigital.ula.ve

Los microorganismos capaces de utilizar esta única fuente de carbono también son capaces de utilizar el nitrógeno del fosfato de amonio presente en el medio, originando como producto de su metabolismo compuestos alcalinos que desencadenan el cambio de color del indicador azul de bromotimol, de color verde a color azul. Si el microorganismo no es capaz de utilizar el citrato no se producirá cambio de color del medio.

Esta prueba se realizó sembrando en estría en agar citrato de Simmons las colonias a identificar e incubando a 30°C durante 24 horas. Finalizado el tiempo de incubación se examinaron los cambios ocurridos en el medio.

4.2.4 Formación de Indol:

Para evidenciar la formación de indol se tomó con un asa una porción del aislado a ensayar y se inoculó en tubos conteniendo agua peptonada. Luego de incubar a 30°C por 24 horas se añadieron al tubo 4 gotas del reactivo de Erlich y se examinó el tubo. Se considera positiva la producción de indol cuando se forma un anillo de color rojo al agregar el reactivo.

4.2.5 Reducción de Nitratos

Esta prueba permite identificar la capacidad de ciertos microorganismos para utilizar el nitrato como aceptor de electrones, ocasionando la reducción de nitratos a nitritos. Para detectar la presencia de nitritos en el medio se utilizan los reactivos α -naftilamina y ácido sulfanílico, lo que desencadena la aparición de un color rojo indicativo de positividad de la prueba (Barrow y Feltham, 2003).

Para ejecutar esta prueba se tomó una porción de la cepa a ensayar y se inoculó en caldo nitrato, incubando a 30°C durante 24 horas. Seguidamente se agregaron 2 gotas de ácido sulfanílico y 2 gotas de α -naftilamina para evidenciar la positividad de la prueba en caso de aparición de color rojo. Si no aparece coloración se agrega una pequeña cantidad de polvo de zinc y el desarrollo de color rojo en este caso indica negatividad de la reacción.

4.2.6 Galerías API® 20E

Para confirmar la identificación de los bacilos gramnegativos fermentadores aislados de las fuentes termales La Musuy se prepararon galerías API® 20E siguiendo las instrucciones del fabricante. Seguidamente, se tomó con un asa una porción de la cepa a ensayar (proveniente de un cultivo de 24 horas en agar TSA) y se depositó en un tubo con 5 mL de solución salina estéril, se agitó levemente para homogeneizar.

A partir de esta suspensión de la cepa se inocularon la serie de 20 microtubos conforman las galerías y se incubaron a 37° C por 24 a 48 horas. Finalizado el tiempo de incubación, se le añadieron los correspondientes reactivos requeridos a los microtubos correspondientes y se procedió a examinar los cambios ocurridos según las distintas pruebas establecidas en el inserto de las galerías. Finalmente, se introdujeron los resultados obtenidos en el software APILAB(Biomerux, Francia) para obtener la identificación y porcentaje de correspondencia de géneros y especies.

4.3 Identificación de bacilos gramnegativos no fermentadores (BGNNF)

Las cepas bacterianas previamente caracterizadas como bacilos gramnegativos no fermentadores (BGNNF), se ensayaron mediante las pruebas bioquímicas adicionales: hidrólisis de esculina, reducción de nitratos, crecimiento a 42°C y mediante el uso de galerías API® 20NE para bacilos gramnegativos no fermentadores.

4.3.1 Hidrólisis de esculina:

Para realizar esta prueba se tomó una porción del aislado y se sembró por estrías en placas de agar esculina, incubando a 30° C durante 24 a 48 horas. Finalizado el tiempo de incubación se examinaron las placas con la finalidad de evidenciar la aparición de una coloración pardo oscuro, indicativa de positividad de la reacción. Dicha coloración se produce por desdoblamiento de la esculina en glucosa y esculina y la consiguiente reacción del hierro con la esculina (Forbes y col., 2004).

4.3.2 Reducción de nitratos:

Se realizó según lo descrito para bacilos gramnegativos fermentadores, utilizando caldo nitrato e introduciendo en el medio una

campana de Durham para evidenciar la formación de gas por desplazamiento de líquido en el interior de la campana.

4.3.3 Crecimiento a 42°C:

Se inocularon las cepas a ensayar en tubos conteniendo caldo nutriente, incubando a 42°C durante 48 horas. Finalizado el tiempo de incubación se examinaron los tubos para evidenciar la presencia de turbidez ocasionada por el crecimiento.

4.3.4 Galerías API® 20NE:

Se procedió de manera similar a lo descrito en la sección 2.2.6 de este trabajo, siguiendo las instrucciones del fabricante.

5. Aislamiento de bacterias potencialmente patógenas

5.1 Aislamiento de *Staphylococcus aureus*

Para realizar la determinación de *S. aureus* se realizó la filtración de un volumen de 50 mL de cada muestra de agua termal usando un filtro de 0,45 µm de diámetro de poro. Posteriormente los filtros se depositaron en un frasco Erlenmeyer conteniendo caldo caseína de soya (ver composición en Tabla 20) y se incubó en estufa (Memmert, Alemania) a 37°C durante 24 horas.

Tabla 20.- Composición del Caldo caseína de Soya

Ingrediente	g/L
Digerido pancreático de caseína	17
Digerido papaínico de harina de soya	3
Cloruro de sodio	5
Fosfato dipotásico	2.5
Glucosa monohidrato	2.5
pH después de esterilizar	7.0±0.2

Fuente: HIMEDIA Technical Data M290

Finalizado el tiempo de incubación en caldo de cultivo, se tomó un asa del caldo y se sembró por estría en superficie en placas de agar Baird-Parker (Himedia, India) y se incubó a 37°C durante 48 horas. Se consideraron colonias presuntivas para *Staphylococcus aureus*, aquellas colonias pequeñas de color negro brillante, rodeadas de un halo opaco, en cuyo caso se aislaron en agar BHI para su posterior identificación.

Tabla 21.- Composición del agar Baird Parker

Ingrediente	g/L
Digerido pancreático de caseína	10
Extracto de carne	5
Extracto de levadura	1
Glicina	12
Piruvato sódico	10
Agar	20
pH después de esterilizar	7.0±0.2

Fuente: HIMEDIA Technical Data M043

Nota: A temperatura ambiente se añade 50 mL de emulsión de yema de huevo y 10 mL de Telurito potásico (1 %).

5.2 Aislamiento de *Salmonellasp.*

Se utilizó la técnica de filtración por membrana, utilizando filtros de 0.45 μ de diámetro de poro. Se filtró un volumen de 250 mL de cada muestra de agua termal y seguidamente se introdujo cada filtro en su respectivo frasco Erlenmeyer conteniendo caldo caseína de soya, y se incubó en estufa (Memmert, Alemania) a la temperatura de 37°C durante un período de 24 horas.

Una vez culminada la incubación en caldo caseína de soya, se tomó 1mL del caldo y se inoculó en un tubo de ensayo con caldo selenito (ver composición en Tabla 22). Paralelamente se tomó 1mL del caldo incubado de caseína de soya y se transfirió a otro tubo de ensayo con caldo tetracionato (Himedia, India).

Ambos tubos de ensayo se incubaron en estufa (Memmert, Alemania) a la temperatura de 37° C durante 24 horas. Una vez cumplido este tiempo, se tomaron asadas de cada tubo y se realizó siembra por agotamiento en superficie en placas de los siguientes agares (ver composición de los medios en las Tablas 23a 26): Salmonella-Shigella, verde brillante Rojo Fenol y Bismuto sulfito. Todas las placas sembradas se incubaron en estufa (Memmert, Alemania) a 37°C durante un período de 24 a 48 horas.

Tabla 22.- Composición del caldo Selenito

Ingrediente	g/L
Peptona	5
Lactosa	4
Fosfato disódico	10
Selenito monosódico	4
pH después de esterilizar	7.0 \pm 0.2

Fuente: HIMEDIA Technical Data M1079

Tabla 23.-Composición del Caldo Tetratonato (Mueller Kauffman)

Ingrediente	g/L
Digerido pancreático de caseína	2.5
Digerido péptico de tejido animal	2.5
Sales biliares	1
Carbonato cálcico	10
Tiosulfato sódico	30
pH después de esterilizar	7.0±0.2

Fuente: HIMEDIA Technical Data M876

Nota: Cuando se va a utilizar el medio debe añadirse 20 mL de una solución yodo-yodurada y 10mL de la solución verde brillante 0,1% y mezclar.

Tabla 24.- Composición del Agar Salmonella-Shigella

Ingrediente	g/L
Peptona proteasa	5
Lactosa	10
Sales biliares	8.5
Citrato de sodio	8.5
Tiosulfato sódico	8.5
Citrato Férrico	1
Verde brillante	0.00033
Rojo neutral	0.025
Agar	13.5
pH después de esterilizar	7.0±0.2

Fuente: HIMEDIA Technical Data M108D

Se consideran presuntivas como *Salmonella* sp. las colonias de color translúcido con centro negro debido a la producción de H₂S, las cuales deben confirmarse a través de pruebas bioquímicas.

Tabla 25.- Composición del agar Bismuto-Sulfito

Ingrediente	g/L
Peptona	5
Extracto de carne	5
Glucosa	5
Fosfato disódico	4
Sulfato ferroso	0.30
Sulfato de bismuto (Indicador)	8
Verde brillante	0.025
Agar	20
pH después de esterilizar	7.7±0.2

Fuente: HIMEDIA Technical Data M027

En el agar bismuto sulfito crece *S. tify*, *S. enteritidis* y *S. tiphymurium* como colonias negras rodeadas de un halo metálico debido a la producción de H₂S. La especie *S. paratify* crece como colonias de color verde claro.

Tabla 26.- Composición del agar verde brillante Rojo Fenol

Ingrediente	g/L
Extracto de carne	5
Digerido péptico de tejido animal	5
Dihidrógeno Fosfato de sodio	0.600
Fosfato Hidrógeno disódico	1
Lactosa	10
Sacarosa	10
Rojo Fenol	0.090
Verde brillante	0.005
Agar	15
pH después de esterilizar	7.0±0.1

Fuente: HIMEDIA Technical Data M1693

www.bdigital.ula.ve

Se consideran presuntivas como *Salmonella* sp. las colonias de color rojo o rosado pálido con un halo opaco de color rojo en el medio de cultivo verde brillante rojo fenol, las cuales deben confirmarse a través de pruebas bioquímicas.

6. Determinación de indicadores de calidad sanitaria

6.1 Coliformes totales y fecales

La determinación de coliformes totales y coliformes fecales, se efectuó mediante la técnica de filtración por membrana, utilizando placas de Agar Eosina Azul de Metileno (Himedia, India) debidamente rotuladas con el código de cada muestra de agua termal (ver composición del agar en la Tabla 27). En este caso se filtraron 250 mL de cada muestra de agua termal

a través de filtro de 0.45μ de diámetro de poro, seguidamente los filtros se sembraron en las placas de agar y se incubaron a dos temperaturas distintas. Para la determinación de coliformes totales se incubó en estufa a 37°C durante 48 horas y para la detección de coliformes fecales se incubó a 44.5°C en baño de agua (Memmert, Alemania).

Una vez cumplido el tiempo de incubación, se procedió a observar las colonias con aspecto característico. En el caso de *Escherichia coli* se trata de colonias púrpura con centro negro y brillo metálico de apariencia verdosa alrededor, mientras que *Enterobacter* sp. se manifiesta como colonias rosadas sin brillo. En el caso de *Klebsiella* sp. se observan colonias mucoides de color rosado. El resultado del contaje realizado en un cuenta colonias (J.E. Gerber Zurich, Alemania) se expresó como unidades formadoras de colonia (UFC) por cada 250mL de agua.

Tabla 27.- Composición del agar Eosina Azul de Metileno

Ingrediente	g/L
Peptona	10
Fosfato Dipotásico	2
Eosina Y	0.400
Azul de metileno	0.065
Agar	15
pH después de esterilizar	7.3±0.2

Fuente: HIMEDIA Technical Data M301

6.2 Determinación de *Pseudomonasaeruginosa*

La determinación de *Pseudomonas aeruginosa* en las muestras de agua también se realizó por la técnica de filtración en membrana, filtrando un volumen 250 mL de cada muestra de agua termal a través de un filtro de

0,45 μ de diámetro de poro utilizando. Una vez filtrada la muestra, el filtro se depositó sobre la superficie del medio de cultivo Agar Cetrimida (Himedia, India) y se incubó en estufa (Memmert, Alemania) a 42°C durante 24 horas (ver composición del agar en la Tabla 28). Finalizado el tiempo de incubación se examinaron las placas a fin de detectar colonias características de la especie *Pseudomonas aeruginosa*, es decir colonias pequeñas de color azul-verdoso y se realizó el recuento en el cuenta colonias (J.E. Gerber Zurich, Alemania).

Tabla 28.- Composición del agar Cetrimida

Ingrediente	g/L
Gelatina Peptona	20
Cloruro de Magnesio	1.400
Sulfato de Potasio	10
Cetrimida	0.300
Agar	15
pH después de esterilizar	7.2 \pm 0.2

Fuente: HIMEDIA Technical Data M024

6.3 Mohos y Levaduras

Para determinar la presencia de mohos y levaduras en las muestras de agua termal recolectadas, se utilizó nuevamente la técnica de filtración en membrana, filtrando 100 mL de cada muestra a través de filtros de 0.45 μ de diámetro y depositando los filtros sobre la superficie de placas de Agar Saboraud Dextrosa (Himedia, India) previamente rotuladas. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante un período de 5 a 7 días (ver composición del agar en la Tabla 29) para observar el crecimiento de

colonias típicas de mohos y levaduras y proceder a su recuento finalizado el tiempo de incubación (APHA, 2005).

Tabla 29.- Composición del agar Saboraud Dextrosa

Ingrediente	g/L
Dextrosa	40
Peptona micológica	10
Agar	15
pH después de esterilizar	5.6±0.2

Fuente: HIMEDIA Technical Data M063

7. Evaluación del perfil de resistencia antimicrobiana

Para determinar la resistencia antimicrobiana de las cepas provenientes de los manantiales termales, una vez aisladas e identificadas taxonómicamente se procedió a ensayar la susceptibilidad a una serie de antibióticos previamente seleccionados de acuerdo a la prueba de difusión del disco establecida por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCLSI, 2015). Para esto se prepararon suspensiones de las cepas a ensayar, tomando una asada del cultivo fresco y suspendiéndolo en un tubo de agua destilada estéril, de modo de obtener una suspensión equivalente al patrón 0,5 de Mc Farland.

Una vez obtenidas las suspensiones, se sembraron por extensión en la superficie de placas de Agar Mueller-Hinton BD (Fisher Scientific, Estados Unidos) utilizando un hisopo estéril para hacer un extendido por toda la placa (ver composición del agar en la Tabla 30) e inmediatamente se colocaron los discos de los antibióticos a ensayar con ayuda de una pinza.

Los antibióticos ensayados fueron los siguientes: amikacina, ampicilina, ácido nalidíxico, aztreonam, cefotaxime, ciprofloxacina, eritromicina, imipenem, meropenem, netilmicina, tigeciclina, tobramicina, trimetoprim-sulfa.

Tabla 30.- Composición del agar Mueller Hinton

Ingrediente	g/L
Digesto Ácido de caseína	17.5
Extracto de Carne	2
Almidón	1.5
Sangre de cordero (opcional)	5%
Agar	17
pH después de esterilizar	7.3±0.1

Fuente: Fisher Scientific Specifications

www.bdigital.ula.ve

8. Detección de actividades biológicas

8.1 Biodegradación del almidón:

Para determinar la producción de la enzima amilasa por parte de los microorganismos presentes en las muestras de aguas termales, se utilizó la técnica del número más probable (NMP). Para ejecutar la técnica se prepararon series de tres tubos conteniendo medio de cultivo para microorganismos amilolíticos (ver composición del medio en Tablas 31 y 32) y en cada serie de tubos se inocularon respectivamente 10 mL, 1mL y 0.1mL de cada muestra de agua termal y se incubaron a 28 °C por 30 días.

Tabla 31.- Composición del medio para microorganismos amilolíticos

Ingrediente	g/L
Almidón	1.5
Nitrato amónico	1
Solución salina Winogradsky	50 mL
Extracto de tierra	10 mL
Agua	1000 mL
pH	7.0±0.2

Fuente: Barrow y Feltham (2003).

Tabla 32.- Composición de la solución salina de Winogradsky

Ingrediente	Cantidad
Fosfato dipotásico	5.0 g
Sulfato magnésico	2.5 g
Cloruro sódico	2.5 g
Sulfato férrico	0.05 g
Sulfato manganoso	0.05 g
Agua	1000 mL

Fuente: Barrow y Feltham (2003).

Durante este lapso de incubación los tubos se examinaron diariamente con la finalidad de comprobar la presencia de microorganismos amilolíticos. Para realizar esta comprobación se tomó 0.1 mL del medio inoculado en un tubo de ensayo y se añadieron 2 gotas de solución yodo-yodurada (ver composición de la solución en Tabla 33) y 1 mL de agua destilada, agitando levemente. Se considera positiva la reacción cuando se visualiza en el tubo la aparición de una coloración amarillo ámbar, mientras que la reacción se

considera negativa cuando aparece un color azul en el medio (Barrow y Feltham, 2003).

Tabla 33.- Composición de la solución yodo-yodurada

Ingrediente	Cantidad
Yodo resublimado	1 g
Ioduro potásico	2 g
Agua destilada	300 mL

Fuente: Barrow y Feltham (2003).

Con la finalidad de monitorear las posibles variaciones en la presencia de microorganismos celulolíticos a lo largo de los diferentes muestreos realizados en las fuentes termales durante el tiempo de estudio, se cuantificaron los microorganismos amilolíticos utilizando las tablas correspondientes al método del NMP y los resultados se expresaron por cada 100 mL de agua termal. De cada tubo con reacción positiva para la producción de amilasa se tomó una asada y se hizo aislamiento de las cepas en agar almidón para proceder a su posterior identificación mediante pruebas bioquímicas.

8.2 Biodegradación de celulosa:

Para ensayar la actividad celulolítica de los microorganismos de las fuentes termales de La Musuy, se utilizó el método del número más probable (NMP), y se procedió de manera similar al ensayo anterior, inoculando volúmenes de muestra de agua termal de 10 mL, 1mL y 0.1mL en series de tres tubos conteniendo medio de cultivo celulosa (ver composición en Tabla 34) con una tira de papel de filtro en su interior. Los tubos se incubaron a 28°C por 30 días, examinando diariamente los tubos. La aparición de

manchas u orificios en las tiras de papel de filtro indica que es positiva la producción de celulasas. Para realizar el recuento de microorganismos celulolíticos se usaron las tablas del NMP y el resultado se expresó por cada 100 mL de agua termal. De cada tubo con reacción positiva para la producción de celulasa se tomó una asada y se hizo aislamiento de las cepas en agar celulosa para proceder a su posterior identificación mediante pruebas bioquímicas.

Tabla 34.- Composición del medio con celulosa

Ingrediente	Cantidad
Solución salina Winogradsky	50 mL
Extracto de Tierra	20 mL
Nitrato amónico	1 g
Agua destilada	1000 mL

Fuente: Barrow y Feltham (2003).

Nota: En cada tubo de ensayo conteniendo el medio de cultivo se debe colocar una tira de papel de filtro de 1 cm de ancho que rebasa en 1-2 cm la superficie del líquido.

8.3 Biodegradación de proteínas:

Para ensayar la producción de enzimas proteasas por los microorganismos presentes en las fuentes termales en estudio, se usó la técnica del NMP según lo descrito en los ensayos anteriores utilizando el medio de cultivo gelatina (ver composición en la Tabla 22). Al igual que en los casos anteriores, los tubos inoculados con las muestras de agua se incubaron a 28°C por 30 días y se realizaron observaciones diarias para comprobar si se producía licuefacción de la gelatina.

Tabla 35.- Composición del medio gelatina

Ingrediente	Cantidad
Gelatina	30 g
Solución Salina Winogradsky	50 mL
Extracto de Tierra	10 mL
Agua destilada	1000 mL

Fuente: Barrow y Feltham (2003).

La examinación diaria de los tubos se realizaba colocándolos en refrigeración a la temperatura de 2°C durante 1-2 horas y visualizando la aparición de licuefacción en comparación con un tubo control no inoculado. Se consideraba positiva la producción de gelatinasa en aquellos tubos que no se solidificaban. Para realizar el recuento de microorganismos proteolíticos se usaron las tablas del NMP y el resultado se expresó por cada 100 mL de agua termal. De cada tubo con reacción positiva para la producción de gelatinasa se tomó una asada y se hizo aislamiento de las cepas en agar gelatina para proceder a su posterior identificación mediante pruebas bioquímicas.

8.4 Biodegradación de lípidos:

La determinación de la producción de lipasas en microorganismos aislados de las fuentes termales se realizó mediante la técnica de siembra en placa. Para ello, las cepas de microorganismos previamente aislados de las fuentes termales se sembraron en estrías en la superficie de placas de agar tributirina (HIMEDIA, India). Una vez sembradas las placas (ver composición del medio en la Tabla 36) se incubaron a 37°C por 48 a 96 horas y se examinaron a fin de visualizar la presencia de halos claros iridiscentes

alrededor de las colonias, indicativos de la positividad de la prueba (Barrow y Feltham, 2003).

Tabla 36.- Composición del medio agar Tributirina

Ingrediente	g/L
Peptona	5
Extracto de Levadura	3
Agar	15
pH Final	7.5±0.2

Fuente: HIMEDIA Technical Data M157

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Características bioclimáticas de la localidad donde se encuentran las aguas termales estudiadas

Los datos correspondientes a las coordenadas geográficas, altitud, presión atmosférica, temperatura y humedad relativa promedios del sitio de muestreo en las aguas termales de La Musuy se resumen en la Tabla 37.

Tabla 37.- Descripción geográfica y bioclimática de los manantiales termales La Musuy

Coordenadas geográficas	Altitud (m.s.n.m)	Presión atmosférica (mmHg)	Temperatura (°C)	Humedad relativa (%HR)
N8° 47' 51.6'' W70° 51' 65.0''	3308	517,2	18,2	56

En la descripción realizada por Burguera y col., (1983) sobre las aguas termales de Mucuchíes en la década de los ochenta, los autores afirman que la fuente se encuentra localizada al oeste de Mucuchíes, del lado norte de la carretera trasandina, a una altura aproximada de 3100 m.s.n.m., dicha fuente brota de roca granítica y cae sobre una pequeña piscina colectora construida por los habitantes del lugar. Además de esto, los mencionados investigadores reportaron que la temperatura promedio ambiental de la zona para ese entonces era de 9.5°C, y describieron el área conformada por la

vertiente de un pequeño valle cordillerano, con poca vegetación, cercana a un arroyo frío.

En este sentido, resalta el hecho de que la temperatura ambiental reportada por los mencionados autores (9.5°C) difiere bastante de la temperatura promedio actual (18,2°C), lo que se atribuye probablemente al hecho de que la intervención humana en los últimos decenios ha ocasionado grandes variaciones en los ecosistemas naturales, desencadenando un incremento en la temperatura global. Este aumento de temperatura trae consigo una disminución de la humedad relativa y a su vez origina cambios en la composición de especies que puedan estar presentes en el área, razón por la cual se hace necesario concienciar a la población acerca de la importancia de proteger los recursos naturales.

Por otra parte, las características de la vegetación más resaltantes observadas en el área de estudio, así como los parámetros de pH, conductividad y temperatura de las aguas del manantial termal, se reflejan en la Tabla 38.

Tabla38.- Características de la vegetación y del agua termal La Musuy durante los diferentes muestreos

Característica	Muestreo				
	Septiembre 2016	Diciembre 2016	Abril 2017	Junio 2017	Septiembre 2017
Temperatura del agua (°C)	32	30	33	34	32
pH	8,8	9,0	8,5	8,6	9,1
Conductividad Ohmio/cm	510	525	502	530	515
Vegetación predominante	Coníferas principalmente, Gramíneas, algunos Frailejones, Suelo de tipo arenoso				

Fuente: Gutiérrez, 2019.

Partiendo de los datos recopilados en las tablas anteriores, puede afirmarse que la zona en la que se encuentran las aguas termales de La Musuy, posee una temperatura ambiental relativamente baja y una elevada humedad relativa atmosférica, lo que se considera característico de los ecosistemas de páramo. Además de esto se evidencia que las características geográficas de la localidad influyen en las condiciones de las aguas termales, presentando estas una temperatura media entre 30-34°C y una elevada conductividad (502-530 Ohmio/cm), probablemente debido al tipo de suelo existente y al hecho de que se originan en rocas graníticas, lo que hace inferir un alto contenido de minerales en su composición. En relación a su temperatura promedio actual, estas aguas pueden ser consideradas aguas mesotermiales.

En contraste, los parámetros fisicoquímicos reportados por Burguera y col., (1983), para estas mismas fuentes termales comprendían una temperatura promedio del agua de 47°C, un pH de 8.5, densidad igual a 1,003 g/mL y conductividad aproximada de 500 Ohmio/cm. En otras palabras, así como existe una gran diferencia en relación a la temperatura ambiental, lo mismo ocurre con la temperatura del agua, que para el momento en que los investigadores realizaron el estudio era al menos 15°C mayor a la temperatura promedio actual, debido a las condiciones climáticas existentes en esa época. Sin embargo, los datos de pH y conductividad del agua son similares a los obtenidos en el presente estudio, lo que refuerza el hecho de que se trata de aguas alcalinas ricas en minerales.

Adicionalmente, Burguera y col., (1983) reportaron las características organolépticas de las fuentes termales de Mucuchíes como aguas de olor inodoro, sabor insípido, ligeramente astringente y de aspecto cristalino; refiriendo además un residuo por evaporación de 100 mg/L, un flujo medio de 88 L/min y destacaban el hecho de que la fuente poseía para el momento del estudio un contenido de sulfuro de 0,93 mg/L y 0,25 mg/L de Litio, siendo

este último elemento un metal alcalino que resulta muy buen conductor de electricidad.

2. Resultados del aislamiento de bacterias heterótrofas viables cultivables

Los recuentos de bacterias heterótrofas viables presentes en las fuentes termales de La Musuy utilizando diferentes medios de cultivo e incubando a temperatura ambiente y a 37°C dieron como resultado la obtención de colonias en la totalidad de las placas sembradas con las muestras de aguas termales, cuyos valores oscilaron entre 7 a 23 UFC/mL.

En microbiología, el recuento en placa de microorganismos heterótrofos proporciona una estimación del número total de bacterias viables cuando no se dispone de otras técnicas de cuantificación más precisas como la microscopía de epifluorescencia o la citometría de flujo. Esta cuantificación de microorganismos cultivables proporciona información de utilidad sobre la calidad sanitaria de los manantiales termales, siendo un indicativo de las medidas de protección de los acuíferos frente a agentes contaminantes externos (De la Rosa y Mosso, 1995; Cabral, 2010).

En aguas envasadas de tipo mineral el recuento de heterótrofos es un indicador de utilidad para monitorear el proceso de tratamiento del agua de manera de garantizar su aptitud para consumo humano. En los manantiales naturales, un elevado crecimiento microbiano puede afectar las características organolépticas del agua (color, olor, sabor), siendo indicativo de la disponibilidad de nutrientes para crecimiento microbiano y formación de biopelículas que eventualmente pueden albergar Microbiota no patógena cuya actividad metabólica podría generar cambios en la supervivencia de los microorganismos patógenos que pudieran estar presentes (Rodés, 2000; Ramalho, 2001; Cabral, 2010).

En el presente trabajo de investigación, luego de culminada la incubación de las muestras a temperatura ambiente, se obtuvo como resultado un mayor crecimiento de colonias en las placas de agar R2A en comparación con los otros dos medios de cultivo ensayados (Tabla 39). En este sentido, la composición del medio de cultivo agar R2A, diseñado especialmente para el recuento de bacterias en muestras de agua potable, tiene la particularidad de que favorece el crecimiento de las bacterias que se desarrollan más lentamente y que probablemente en otros medios de cultivo enriquecidos serían inhibidas rápidamente por especies de crecimiento más rápido.

Tabla 39.- Recuento de bacterias heterótrofas viables (UFC/mL) en muestras de aguas termales La Musuy incubadas a temperatura ambiente

Muestra	Septiembre 2016			Diciembre 2016			Abril 2017			Junio 2017			Septiembre 2017			X	DE
	AP	R2A	PF	AP	R2A	PF	AP	R2A	PF	AP	R2A	PF	AP	R2A	PF		
NM1	9	10	7	8	9	9	8	14	7	8	9	8	9	11	8	8,9	1.8
NM2	8	11	9	9	14	7	9	12	8	9	11	7	8	10	9	9,4	1.9
PM1	10	12	11	12	12	10	14	18	16	13	16	15	13	14	14	13,3	2.2
PM2	9	14	10	8	10	9	16	17	15	14	12	12	12	13	12	12,2	2,7

NM1: Naciente muestra 1; NM2: Naciente muestra 2; PM1: Pozo muestra 1, PM2: Pozo muestra 2
 AP: Agar Plate Count, R2A: agar R2A, PF: Petrifilm

En relación a los resultados obtenidos utilizando las placas de Petrifilm 3M® para recuento de Aerobios, los contajes fueron similares a los encontrados usando agar Plate Count, lo que coincide con los resultados de diversos investigadores (Chain y Fung, 1991; Schraft y Watterworth, 2005; Andueza, 2006) acerca del uso de placas de Petrifilm para el análisis de muestras de agua, lo que resulta una alternativa comparable a los medios de cultivo recomendados por las referencias oficiales de la AOAC (del inglés

Association of Official Methods of Analysis) y su uso constituye una excelente opción para el recuento microbiano en términos de simplicidad y practicidad.

Para el estudio de los microorganismos presentes en medios acuáticos se han propuesto diversas condiciones de cultivo que permitan cuantificar el mayor número posible de las bacterias presentes en las muestras de agua. Los mejores resultados se han obtenido cuando se siembran las muestras en medios de cultivo con diferente composición nutritiva y periodos de incubación prolongados, ensayando diferentes temperaturas (Ramalho y col., 2001; Leclerc y Moreau, 2002; Andueza, 2006).

Según Leclerc y Moreau (2002) los medios enriquecidos no son los más adecuados para detectar las bacterias acuáticas, ya que algunas bacterias oligotróficas no son capaces de desarrollarse en presencia de altas concentraciones de nutrientes, razón por la cual se utiliza ampliamente el agar Plate Count como medio de cultivo para recuento estándar de microorganismos. En contraste, los medios de cultivo con escasos nutrientes, carecen de cofactores esenciales para el crecimiento microbiano, dificultando aún más el aislamiento de bacterias cultivables, razón por la cual el agar R2A, resulta de elección para aislamiento de microorganismos acuáticos ya que posee mayor diversidad de componentes a bajas concentraciones (Andueza, 2006).

Por otra parte, en la Figura 4 se puede observar ciertas diferencias obtenidas entre los puntos de muestreo de las fuentes termales de La Musuy. Se evidencia que el recuento promedio de heterótrofos viables es mayor en las muestras del pozo (PM1= $13,3 \pm 2,2$ y PM2= $12,2 \pm 2,7$) UFC/mL que en las muestras de la naciente (NM1= $8,9 \pm 1,8$ y NM2= $9,4 \pm 1,9$) UFC/mL incubados a temperatura ambiente. Esto se debe a que probablemente la dificultad de acceso a la naciente de las fuentes termales hace que esta se encuentre más protegida, mientras que el mayor recuento

de viables en los pozos podría atribuirse a la presencia de microorganismos aloctonos dada la mayor afluencia de bañistas y la presencia de vegetación en los alrededores del manantial.

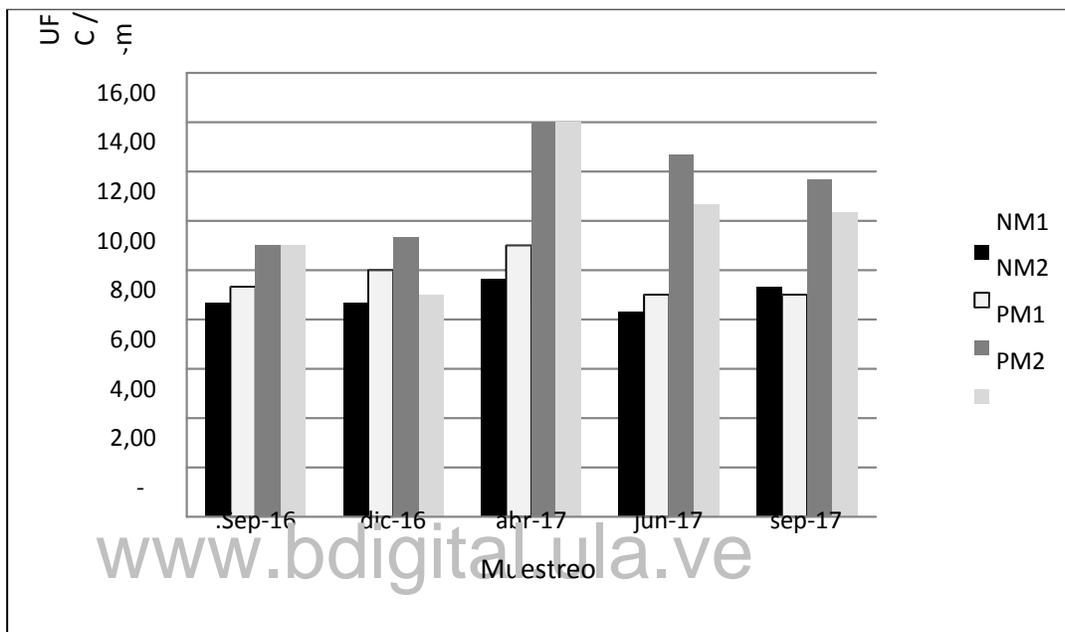


Figura 4.- Recuento de heterótrofos viables incubados a temperatura ambiente por fecha de muestreo en las aguas termales

Adicionalmente, en la mencionada Figura 4 se observa que los recuentos más elevados de heterótrofos viables se obtuvieron durante el muestreo realizado en el mes de abril de 2017, lo que pudiera atribuirse a posibles variaciones ambientales presentes en ese momento particular respecto al resto de los muestreos.

La incubación de las muestras de agua a diferentes temperaturas y duración de los tiempos de incubación, permite incrementar la probabilidad de obtener mayor cantidad de aislados debido a que las bacterias que se

encuentran presentes en el agua pueden provenir de diferentes orígenes (bacterias autóctonas y alóctonas). Para Varnan y Sutherland (1994), citado por Andueza (2006), las temperaturas y tiempos de incubación más adecuados para aislar bacterias autóctonas en aguas frías son: 20-22°C durante 5-7 días en agar Plate Count, mientras que para bacterias patógenas alóctonas resulta más adecuada la incubación entre 35-37° C durante 48-72 horas.

En este estudio, en las muestras de aguas termales incubadas a 37°C no se observaron diferencias particulares en cuanto al recuento de microorganismos en los diferentes medios de cultivo ensayados, obteniéndose valores similares en los recuentos de heterótrofos con los tres medios según se evidencia en la Tabla 40. Sin embargo, resalta el hecho de que el valor promedio anual de heterótrofos viables a la temperatura de incubación de 37°C resultó ser mayor en todos los puntos de muestreo (NM1: 16,8±3.1; NM2: 12,0±3.1; PM1:17,7±2.9 PM2:16,4±3.3) respecto al valor promedio obtenido a la temperatura ambiente.

Tabla 40.- Recuento de bacterias heterótrofas viables (UFC/mL) en muestras de aguas termales La Musuy incubadas a 37°C

Muestra	Septiembre 2016			Diciembre 2016			Abril 2017			Junio 2017			Septiembre 2017			X	DE
	AP	R2A	PF	AP	R2A	PF	AP	R2A	PF	AP	R2A	PF	AP	R2A	PF		
NM1	12	11	14	13	15	12	18	19	20	9	12	11	15	12	14	13,8	3.1
NM2	10	13	12	10	12	10	16	15	17	6	10	8	13	16	12	12,0	3.1
PM1	18	16	15	14	16	15	22	23	21	14	18	17	20	19	17	17,7	2.9
PM2	17	14	16	15	13	16	19	20	23	10	15	13	20	18	17	16,4	3.3

NM1: Naciente muestra 1; NM2: Naciente muestra 2; PM1: Pozo muestra 1, PM2: Pozo muestra 2
 AP: Agar Plate Count, R2A: agar R2A, PF: Petrifilm

En cuanto a las variaciones en los recuentos durante los diferentes muestreos realizados en el año, se obtuvo de manera similar al caso anterior, que los mayores contajes de heterótrofos aerobios en muestras incubadas a 37°C correspondían a las muestras tomadas durante el mes de abril 2017 (Figura 5).

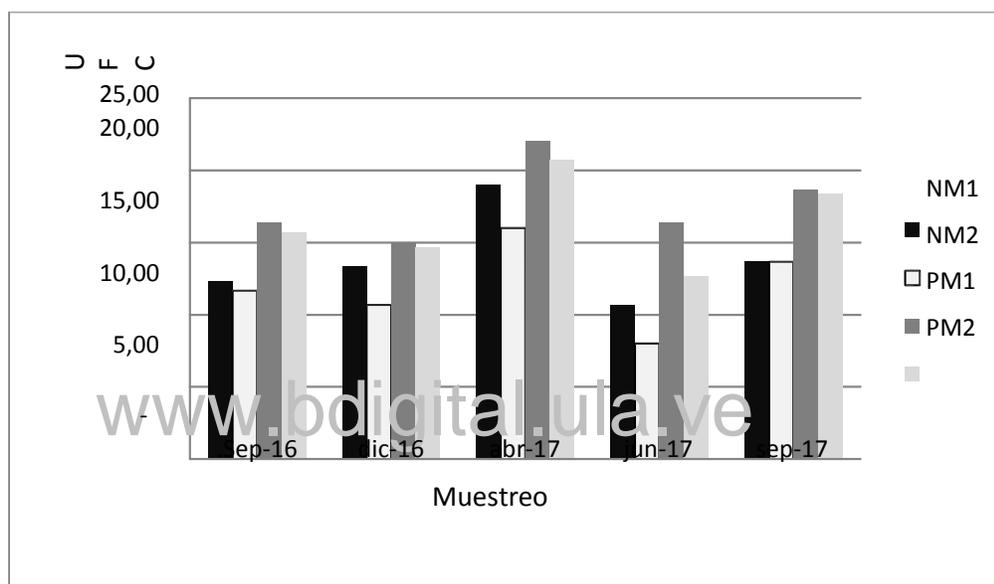


Figura 5.- Recuento de heterótrofos viables incubados a temperatura de 37°C por fecha de muestreo en las aguas termales

Este mayor recuento microbiano obtenido durante el mes de abril 2017, a las dos temperaturas de incubación ensayadas en el laboratorio, permite intuir la asociación con las condiciones climáticas presentes en ese momento de muestreo. En Venezuela, el mes de abril se encuentra dentro de la época de lluvia, por lo tanto es posible que el aumento en las precipitaciones durante ese período haya favorecido el desarrollo de microorganismos, posiblemente algunos de ellos arrastrados por las lluvias desde el suelo o la vegetación circundante.

Asimismo, el mes de abril suele haber mayor afluencia de usuarios a los manantiales termales debido a que coincide con el receso vacacional de la semana santa o semana mayor, lo que hace intuir que es posible un incremento en la presencia de microorganismos alóctonos que inclusive pudiesen constituir parte de la microbiota habitual de los usuarios de los manantiales.

Por otra parte, a pesar de la variedad de medios de cultivo utilizados y las diferencias en las condiciones de incubación, el recuento de heterótrofos viables obtenido en los manantiales termales La Musuy es bajo, siendo inferior en todos los casos a 23 UFC/mL. Esta baja proporción de bacterias aerobias viables generalmente es indicativa de que el perímetro de protección de los manantiales es el adecuado o bien la fuente termal ha sufrido poca intervención por parte del hombre, ya que el crecimiento acelerado de la población ocasiona la contaminación de las fuentes termales, alterándose así su composición química y microbiológica (Andueza, 2003; De La Rosa y Mosso, 2000).

De acuerdo a Urmenta y col (2000), las aguas minerales de origen natural suelen contener una elevada proporción de bacterias, pero solo una pequeña fracción del total son viables cultivables. La microbiota autóctona de estas aguas crece inclusive en presencia de pequeñas cantidades de nutrientes, siendo posible el hecho de que los compuestos liberados por la lisis de restos de células bacterianas provenientes de la población no activa o muerta sean suficientes para permitir el crecimiento bacteriano.

Según diversos autores (Andueza, 2003; De la Rosa y col., 2009; Cabral, 2010), los manantiales termales constituyen ecosistemas oligotróficos con escasas concentraciones de materia orgánica, lo que ocasiona limitaciones en la biodisponibilidad de nutrientes para el crecimiento microbiano. En vista de la carencia de nutrientes, las bacterias heterótrofas adoptan un estado de sobrevivencia conocido como *viables no cultivables*,

trayendo como consecuencia recuentos muy bajos cuando se intenta aislarlas en medios de cultivos apropiados.

En dicho estado de supervivencia, a pesar de que la célula se encuentra metabólicamente activa, es incapaz de experimentar divisiones celulares que le permitan crecer en los medios de cultivo normalmente utilizados para su desarrollo. Las relaciones entre el número de viables, el número total de células y el número de células activas han sido ampliamente estudiados, observándose que en medios de cultivo sólo se detectan entre un 5-10% de las bacterias viables existentes en el ecosistema acuático (Manaia y col., 1990, Urmenta y col., 2000).

Esta baja proporción de microorganismos viables, trae como consecuencia que, de la vasta diversidad microbiana presente en los ecosistemas acuáticos, solo se haya investigado hasta el momento una pequeña fracción. Diversos autores tales como Ferrer (2005) y Rubiano (2006), afirman que la diversidad microbiana, particularmente de las fuentes termales, es una reserva importante de metabolitos primarios, secundarios y enzimas de interés biotecnológico, sin embargo, los métodos tradicionales de cultivo de microorganismos han limitado el análisis a sólo aquellos que son capaces de crecer en condiciones de laboratorio, es decir viables cultivables, requiriéndose el uso de técnicas como la microscopía de epifluorescencia y citometría de flujo para obtener recuentos más representativos de las poblaciones existentes en los medios acuático y el uso de herramientas de biología molecular para la identificación de géneros y especies (Urmenta y col., 2000; Leclerc y Moreau, 2002; Andueza, 2006).

3. Resultados de la Identificación de las cepas bacterianas aisladas

Una vez aisladas las distintas colonias con características morfológicas particulares de cada uno de los medios de cultivo utilizados en el presente trabajo y reaisladas en agar BHI, se procedió a su identificación, empleando de manera preliminar la tinción de Gram y pruebas bioquímicas clave establecidas en la literatura, que permitieran diferenciar entre bacterias fermentadoras y no fermentadoras, para de esta manera seleccionar el tipo de galería API® a utilizar.

En total se aislaron treinta (30) cepas de bacterias heterótrofas procedentes de los manantiales termales de La Musuy. De las cuales se lograron identificar a nivel de género y especie veintisiete (27), lo que representa el 90% de los aislados. Las cepas que no lograron ser identificadas a nivel de género debido a que las pruebas bioquímicas no resultaron concluyentes fueron tres, lo que representa el 10% de los aislados. En relación a la morfología, luego de realizar el frotis y la tinción de dichas cepas, se obtuvo que la totalidad corresponden a bacilos gramnegativos, razón por la cual se prosiguió a realizar las pruebas bioquímicas pertinentes (Tabla 41).

Tabla 41.- Número de cepas de bacterias heterótrofas aisladas en los muestreos de las fuentes termales La Musuy

Cepas bacterianas	Muestreo				
	Septiembre 2016	Diciembre 2016	Abril 2017	Junio 2017	Septiembre 2017
Bacilos Gramnegativos	4	6	10	4	3
No identificadas	-	1	2	-	-
Total	4	7	12	4	3

Fuente: Gutiérrez (2019).

En la figura 6 se puede apreciar la distribución porcentual de las cepas de bacterias heterótrofas aisladas de los manantiales termales de La Musuy, evidenciándose que los mayores porcentajes de aislados se obtuvieron durante los muestreos realizados durante los meses de diciembre 2016 (24%) y abril 2017 (40%), mientras que el menor porcentaje de aislados recuperados se obtuvo en el muestreo de septiembre 2017 (10%).

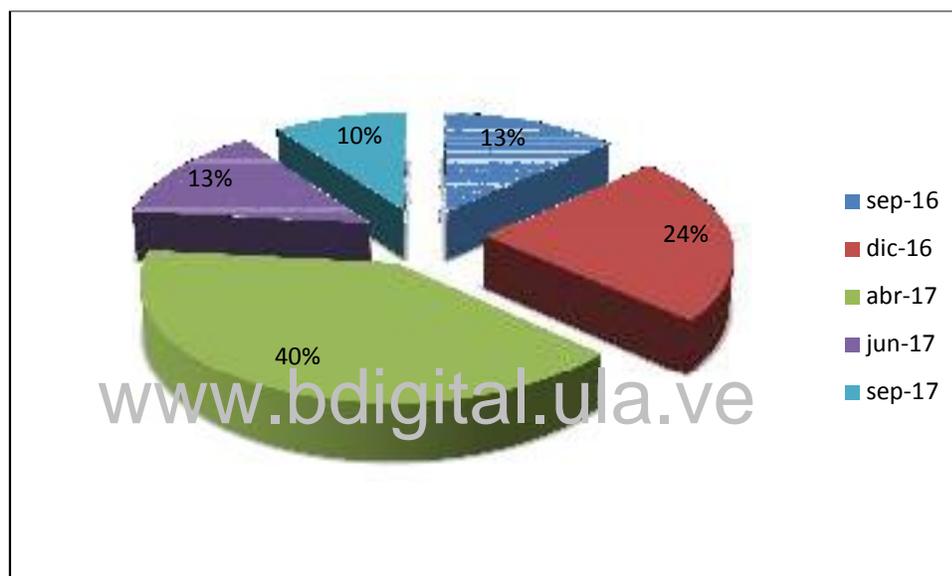


Figura 6.- Distribución porcentual de cepas de bacterias heterótrofas durante los muestreos realizados entre el 2016-2017

Nuevamente se visualiza que el mes de abril se asocia a un comportamiento particular que favorece el metabolismo microbiano, resultante de variaciones en el ecosistema acuático, lo que se manifiesta en los mayores recuentos de heterótrofos viables obtenidos. Resultaría de interés para futuros estudios en estas fuentes termales, realizar los muestreos durante este período de año con el fin de comprobar la variación estacional en la microbiota.

Entre los estudios realizados en Venezuela, en relación con el aislamiento e identificación de bacterias heterótrofas en aguas termales, se encuentra el trabajo de investigación realizado por Alarcón y Correa (2009), quienes analizaron la microbiota de los manantiales termales de Aguas Calientes en el estado Táchira, encontrando que la microbiota bacteriana presente en dicho ecosistema corresponde en su mayoría a bacilos gramnegativos, lo que coincide con los resultados de la tinción de Gram obtenidos en el presente estudio. Como se mencionó anteriormente, en los ecosistemas acuáticos predominan las bacterias gramnegativas, mientras que las especies de grampositivos aislados constituyen una pequeña proporción (alrededor del 6-20%) en relación al total (Cabral, 2010).

De manera similar, Rondón y Villafranca (2012), estudiaron la microbiota bacteriana heterótrofa viable cultivable de las aguas termales del sector aguas calientes de Tabay en el estado Mérida, aislando principalmente cepas de Enterobacterias (58,33%) y bacilos gramnegativos no fermentadores (33,33%), lo que corrobora una vez más el predominio de esta clase de microorganismos en fuentes de agua, debido a que posiblemente la compleja composición de su pared celular les permite sobrevivir en este tipo de ambientes sometidos a variaciones estacionales, aunado a la escasez de nutrientes.

En cuanto a los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a las cepas bacterianas (denominadas desde C1 hasta C30) aisladas de los manantiales termales La Musuy, los mismos se pueden visualizar en la Tabla 42, en la que se resumen los resultados de las pruebas clave para orientar la posterior identificación mediante el uso de Galerías API®.

Tabla 42.- Resultados de las Pruebas bioquímicas preliminares realizadas a las cepas aisladas de la fuente termal La Musuy

Cepa	Pruebas Bioquímicas				Reacción Agar-Kliger
	Oxidasa	Hugh y Leifson		Fermentación Glucosa	
		Oxidación	Fermentación		
C1	+	+	-	-	k/k--
C2	+	+	-	-	k/k--
C3	+	-	+	+	k/A--
C4	+	+	-	-	k/k--
C5	+	-	+	+	A/A--
C6	+	-	+	+	A/A--
C7	+	-	-	-	k/k--
C8	+	+	-	-	k/k--
C9	+	-	+	+	A/A--
C10	+	-	+	+	A/A--
C11	+	-	+	+	k/A--
C12	+	+	-	-	k/k--
C13	+	+	-	-	k/k--
C14	+	-	+	+	A/A--
C15	+	-	-	-	k/k--
C16	+	-	-	-	k/k--
C17					k/k--
C18	+	-	-	-	k/k--
C19	+	-	-	-	k/k--
C20	+	+	-	-	k/k--
C21	+	+	-	-	k/k--
C22	+	-	-	-	k/k--
C23	+	-	-	-	k/k--
C24	+	-	-	-	k/k--
C25	+	-	+	+	A/A--
C26	+	-	+	+	A/A--
C27	+	-	+	+	A/A--
C28	+	+	-	-	k/k--
C29	++	++	-	-	k/k--

K= Alcalino (rojo) A= Ácido (amarillo)

Partiendo de los resultados anteriores se realizó la identificación de los géneros y especies de bacterias presentes en la fuente termal utilizando las galerías API 20E[®] (Biomerux, Francia) para los microorganismos fermentadores y las galerías API 20NE[®] (Biomerux, Francia) para microorganismos no fermentadores.

Es necesario destacar, que desde el punto de vista taxonómico, la clasificación de los bacilos gramnegativos no fermentadores suele ser compleja. Estos microorganismos pertenecen al Dominio *Bacteria* (Eubacteria) y se agrupan en dos *Phylum: Proteobacteria* y *Flavobacteria*. Las especies que causan infecciones en el hombre residen en la clase *gamma-Proteobacteria* (Familia: *Pseudomonadaceae*, *Moraxellaceae* y *Xanthomonadaceae*). El desarrollo de métodos de identificación moleculares ha permitido incrementar la precisión en la identificación de especies, sin embargo existen algunos miembros de este grupo cuya ubicación no ha sido suficientemente aclarada (Cabral, 2010).

En este sentido, particularmente en Venezuela, existen pocos estudios acerca de la biodiversidad de las especies microbianas presentes en las distintas aguas termales del país. La mayoría de los trabajos reportados en la literatura corresponden al análisis de la composición fisicoquímica de las aguas y búsqueda de metabolitos biológicos, concediendo poca importancia a la caracterización de la población microbiana autóctona de cada fuente de agua estudiada, razón por la que se considera que la identificación de las especies bacterianas de las aguas termales de La Musuy puede constituir un precedente para futuras investigaciones en el área.

De La Rosa y Mosso (1995) señalan que los manantiales termales poseen una gran diversidad microbiana que aunque no es específica de cada uno de ellos, permite observar una cierta relación entre algunos microorganismos y las aguas con características fisicoquímicas más extremas de pH, temperatura, salinidad y radiactividad. En este contexto, los manantiales con pH alcalino tal como es el caso de las aguas termales de La Musuy, suelen tener poca diversidad microbiana, encontrándose principalmente especies de los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, entre otras capaces de vivir a estos valores de pH.

En relación al uso de las galerías de identificación API, Oderiz y col., (2011) sostienen que este método constituye una herramienta confiable en la

identificación de microorganismos, representando una valiosa herramienta de fácil acceso, sencilla y rápida en caso de no disponer de técnicas moleculares para el estudio. Adicionalmente, los resultados obtenidos mediante galerías API suelen tener un elevado porcentaje de correspondencia con los resultados obtenidos mediante las técnicas moleculares sobre todo a nivel de género.

Según se evidencia en la figura 7, en este trabajo de investigación, del total de 30 cepas aisladas, sólo se lograron caracterizar como bacilos gramnegativos fermentadores o no fermentadores 27 cepas. De estas 27 cepas, un total de nueve (33%) corresponden a bacilos gramnegativos fermentadores de carbohidratos, mientras que las dieciocho cepas restantes (67%) resultaron bacilos gramnegativos no fermentadores.

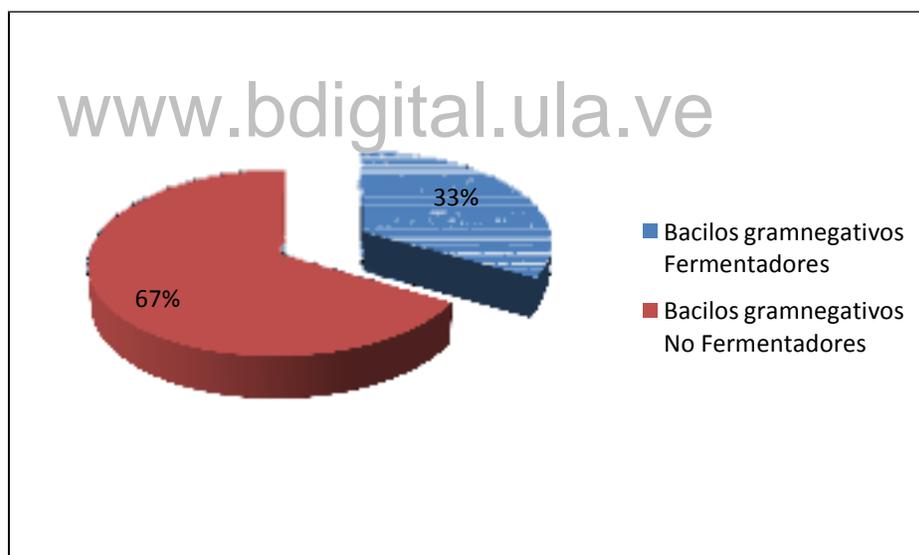


Figura 7.- Distribución porcentual de cepas de bacilos gramnegativos fermentadores y no fermentadores aislados de las fuentes termales La Musuy

En la tabla 43, se pueden apreciar los resultados de las pruebas de identificación contenidas en la galería API 20E® para las cepas fermentadoras de carbohidratos aisladas de las aguas termales La Musuy. Se agruparon las cepas que describieron el mismo comportamiento al realizar las pruebas bioquímicas.

Tabla 43.- Resultados de la identificación de las cepas aisladas utilizando las galerías API 20E®

Pruebas	Cepas		
	C3-C11	C5-C14	C6-C9-C10 C25-C26
ONPG (β -galactosidasa)	+	-	-
ADH (Arginina dihidrolasa)	+	+	+
LDC (Lisina descarboxilasa)	-	-	-
ODC (Ornitina descarboxilasa)	-	-	-
CIT (utilización del citrato)	-	-	-
H ₂ S (producción de H ₂ S) URE (urea)	-	-	-
TDA (triptófano desaminasa)	+	-	-
IND (producción de indol)	-	-	-
VP (producción de acetoina)	-	-	-
GEL (gelatinasa)	-	+	+
GLU (oxidación-fermentación de Glucosa)	+	+	+
MAN (oxidación-fermentación de manitol)	+	+	-
INO (oxidación-fermentación de inositol)	+	-	+
SOR (oxidación-fermentación de sorbitol)	+	-	+
RHA (oxidación-fermentación de rhamnosa)	+	-	+
SAC (oxidación-fermentación de sacarosa)	+	-	+
MEL (oxidación-fermentación de melbiosa)	+	-	+
SAC (oxidación-fermentación de sacarosa)	+	-	-
AMY (oxidación-fermentación de amigdalina)	-	-	-
ARA (oxidación-fermentación de arabinosa)	-	-	-
OX (citocromo oxidasa)	+	+	+

De manera similar, para las cepas de bacterias heterótrofas no fermentadoras de carbohidratos aisladas, se utilizaron las pruebas de identificación contenidas en la galería API 20NE[®], obteniéndose los resultados que se reflejan en la Tabla 44.

Tabla 44. Resultados de la identificación de las cepas aisladas de las fuentes termales utilizando las galerías API 20NE[®]

Prueba	Cepas								
	C1 C8	C2 C13 C29	C4 C12	C7 C15	C17 C19	C18 C24	C21 C28	C16 C22	C20
NO ₃ (Reducción de nitratos en nitritos/ nitrógeno)	-	+	+	-	+	+	+	+	+
TRP (Formación de indol/ triptófano)	-	-	+	-	-	-	-	-	-
GLU (Fermentación glucosa)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ADH (Arginina dihidrolasa)	-	-	-	-	-	-	+	-	-
URE (ureasa)	-	-	-	-	-	-	+	-	-
ESC (hidrólisis β-glucosidasa/ Esculina)	+	+	+	-	-	-	-	-	-
GEL (hidrólisis proteasa/ Gelatina)	-	+	-	+	-	+	+	-	+
PNPG (β-galactosidasa/p-ntrofenil-β-D-galactopiranosidasa)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLU (asimilación glucosa)	-	+	-	-	+	-	+	+	-
ARA (asimilación arabinosa)	-	+	-	-	-	+	-	-	-
MNE (asimilación manosa)	-	+	-	-	-	-	-	-	-
MAN (asimilación manitol)	-	+	-	-	+	-	+	-	-
NAG (asimilación N-acetil-glucosamina)	-	+	-	-	+	-	+	-	-
MAL (asimilación maltosa)	-	+	+	-	+	-	-	-	-
GNT (asimilación gluconato-potásico)	-	+	+	-	+	-	+	+	-
CAP (asimilación ácido cáprico)	-	+	-	-	+	+	+	+	+
ADI (asimilación ácido adípico)	-	+	+	-	-	-	+	-	-
MLT (asimilación malato)	-	+	+	-	+	+	+	+	+
CIT (asimilación citrato trisódico)	-	+	+	-	+	+	+	+	-
PAC (asimilación ácido fenilacético)	-	+	-	-	-	-	-	-	-
OX (citocromo oxidasa)	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Una vez obtenidos los resultados anteriores, se introdujeron los datos provenientes de las pruebas realizadas a cada cepa, en las galerías API en el software APILAB (Bio-Mériux), a fin de determinar los géneros y especies presentes en los manantiales termales La Musuy, resultando las especies

bacterianas que se refleja en la siguiente tabla (Tabla 45). Cabe destacar que las cepas que no se lograron identificar fueron las cepas C23, C27 y C30.

Tabla 45.- Identificación de Géneros y Especies aisladas de los manantiales termales La Musuy

Cepas	Especie	% Correspondencia
C1, C8	<i>Brevundimonas vesicularis</i>	93.7
C2, C13, C29	<i>Burkholderia cepacia</i>	99.9
C3, C11	<i>Aeromonas hydrophila</i>	74.6
C4, C12	<i>Alcaligenes denitrificans</i>	96.8
C5, C14	<i>Aeromonas salmonicida</i>	99.9
C6, C9, C10, C25, C26	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	82.7
C7, C15	<i>Weeksella virosa</i>	80.3
C17, C19	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	87.4
C18, C24	<i>Comamonas tetosteroni</i>	89.3
C20	<i>Shewanella putrefaciens</i>	88.7
C21, C28	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	95.6
C16, C22	<i>Ralstonia pickettii</i>	97.6

En la tabla 45 se puede apreciar que en la fuente termal de La Musuy se identificaron las especie *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas aeruginosa*. En este sentido, cabe destacar que el género *Pseudomonas* se encuentra ampliamente distribuido en los ecosistemas acuáticos, inclusive se han aislado especies pertenecientes a este género en agua mineral envasada proveniente de Alemania, estados Unidos y Francia (Andueza, 2003).

Según Manaia y col., (1990), la especie *P. fluorescens* se ha aislado en pequeña cantidad en agua mineral envasada y almacenada, aunque también en las fuentes minerales naturales suele ser el principal componente

de la población microbiana sobre todo en los puntos de emergencia de agua, lo que coincide con los resultados encontrados en el presente trabajo de investigación.

De manera similar, la especie *Burkholderia cepacia*, encontrada en la presente investigación en la fuente termal de La Musuy, ha sido reportada por otros autores como una especie frecuente en los puntos de emergencia de aguas de manantiales minerales (Andueza, 2003). Por su parte, Flores (2014), en un estudio realizado en las fuentes termales de Santa Apolonia, municipio Tulio Febres Cordero, del estado Mérida, logró aislar 18 cepas bacterianas correspondientes a bacilos gramnegativos no fermentadores, los cuales fueron posteriormente identificados mediante el sistema API como pertenecientes a las especies *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *C. tetosteroni*, *S. putrefaciens* y *B. cepacia*, lo que corrobora el hecho de que son especies frecuentes en aguas termales.

Respecto a las especies *Brevurdimonas vesicularis*, *Aeromonas hydrophila* y *Aeromonas salmonicida*, presentes en el manantial de La Musuy, también se han reportado previamente en aguas de manantiales termales en España (Andueza, 2003). Particularmente, las especies *A. hydrophila*, *P. aeruginosa* y *S. putrefaciens*, habían sido aisladas anteriormente en esta misma fuente termal de La Musuy, junto con especies de *Staphylococcus* spp. en un estudio realizado por Niño y Peña (2013).

Dichos autores concluyen que la presencia de patógenos oportunistas en las aguas termales de la Musuy, probablemente se asocia a filtraciones de agua procedentes de poblaciones cercanas a las fuentes o son provenientes de ríos aledaños, por lo que recomiendan la protección del manantial. Al igual que en los trabajos mencionados previamente, resalta la frecuencia de los miembros de la familia Pseudomonadaceae y Aeromonadaceae en los cuerpos de agua.

Particularmente en este trabajo de investigación se encontró la especie *Aeromonas salmonicida*, siendo la primera vez que se reporta esta especie en aguas termales de la región. Dicha especie se considera la única especie psicrófila dentro de la familia Aeromonadaceae, siendo un microorganismo patógeno para los peces, mientras que en el hombre no ocasiona ningún tipo de infección (Winn y col., 2008).

En relación a la especie encontrada en este estudio, *Brevundimonas vesicularis*, la cual pertenece a la familia Caulobacteriaceae, esta se considera un microorganismo alóctono, que ha sido aislado en los bioaerosoles generados por la lluvia, lo que constituyen un medio de dispersión de microorganismos y esporas capaces de sobrevivir en la atmósfera siendo transportados vertical y horizontalmente debido a las variaciones de temperatura y humedad producto del cambio climático, desde donde caen en los cuerpos de agua pudiendo convertirse en oportunistas causantes de infecciones en el humano (Ruiz, 2016).

Mosso y col., (2006), en un estudio realizado en las aguas termales del balneario cervantes en España, identificaron como géneros principales de la composición microbiana del manantial, los géneros *Pseudomonas*, *Aeromonas* y *Burkholderia*, los cuales coinciden con los encontrados en las fuentes termales de La Musuy. Además de esto encontraron microorganismos proteolíticos, amilolíticos y amonificantes en número alto ($10^4/100$ mL), sulfato reductores en número medio ($10^2/100$ mL), celulolíticos y halófilos, demostrando la importante bioactividad que pueden tener algunas especies de los mencionados géneros.

La especie *B. cepacia* aislada en las aguas termales de La Musuy, pertenece a la familia Burkholderiaceae, es un patógeno del ser humano, responsable de ocasionar infecciones respiratorias. Govan y Deretic (2006) afirman que *B. cepacia* y *P. aeruginosa* son los principales protagonistas en la patogénesis asociada a la fibrosis quística, destacando el hecho de que *B. cepacia* posee resistencia innata a una vasta diversidad de antibióticos y es

capaz de diseminarse rápidamente de persona a persona ocasionando complicaciones respiratorias que pueden llevar a la muerte.

Por otra parte, esta notable resistencia a los antimicrobianos de *B. cepacia* ha sido aprovechada para inducir experimentalmente la producción de antibióticos por dicha especie. En un estudio realizado por Egas y Tinajero (2016), en cepas aisladas del suelo en regiones naturales de Ecuador, lograron establecer las condiciones óptimas para el crecimiento y producción de antibióticos por la mencionada especie, y posteriormente por espectroscopia infrarroja evidenciaron la presencia de grupos funcionales característicos en la molécula de antibiótico extraído. Esta clase de estudios demuestran que a pesar de que la especie aislada en las aguas termales de La Musuy puede representar un riesgo para la salud de los pacientes que acuden a las aguas termales sin control sanitario, también representa una fuente productora de compuestos de interés farmacéutico.

En relación a la especie aislada en las aguas termales de La Musuy, *Alcaligenes denitrificans*, es una bacteria de vida libre que se encuentra con frecuencia en los cuerpos de agua, perteneciente al orden Burkholderiales, familia Alcaligenaceae (Winn y col., 2008). La importancia de esta especie en los ecosistemas acuáticos radica en su capacidad de producir metabolitos con efecto alguicida. Manage y col., (2000) demostraron que la especie *A. denitrificans* es capaz de inhibir el crecimiento en medios de cultivo de las especies de algas *Microcystis aeruginosa*, *Microcystis viridans* y *M. wesenbergii*. En otras palabras, esta especie juega un papel fundamental en la diversidad microbiana de las aguas.

Otra especie aislada en las fuentes de La Musuy fue *Weeksella virosa*, perteneciente a la familia Flavobacteriaceae. Dicha especie ha sido reportada como causante de neumonía y sepsis bacteriana en neonatos y pacientes inmunocomprometidos, cuyo tratamiento consiste en la administración de antibióticos β -lactámicos debido a que la bacteria es resistente a los aminoglucósidos (Manogaran y col; 2004; Mokapati, 2013).

Asimismo, Reina y col., (1990) aislaron *W. virosa* del tracto genitourinario de 707 pacientes femeninas, describiendo la obtención de colonias en agar sangre de apariencia característica: aspecto mucoso intenso, adherentes, color crema, productoras de pigmento amarillo no difusible. Tales autores sugieren además la posible transmisión sexual de este microorganismo debido a la alta prevalencia del mismo. En este sentido, destaca la importancia del adecuado control sanitario de las fuentes termales debido a la gran afluencia de usuarios asociada a la posible presencia de este patógeno.

En cuanto a la variación estacional de las especies identificadas en este trabajo de investigación, en la tabla 46 se puede apreciar que en total se lograron identificar nueve (09) géneros y doce (12) especies. Siendo la especie más frecuentemente detectada *Pseudomonas fluorescens*, la cual estuvo presente en la totalidad de los muestreos realizados, seguida por *Burkholderia cepacia*, que sólo estuvo ausente en los muestreos de septiembre y diciembre 2016.

En cuanto a las especies menos frecuentes durante los muestreos fueron *Shewanella putrefaciens*, *Ralstonia pickettii* y *Weeksella virosa*, las cuales fueron detectadas sólo durante el muestreo de junio 2017.

El resto de las especies identificadas en este estudio, estuvieron presentes en más de un muestreo entre el 2016-2017. Adicionalmente, en la tabla 46 también se logra apreciar que la mayor diversidad de especies se obtuvo en el muestreo realizado en junio 2017, aislando un total de ocho especies diferentes, mientras que el mes en que se obtuvo menor biodiversidad fue diciembre 2016 con sólo tres especies.

Tabla 46.- Especies identificadas en las fuentes termales La Musuy a lo largo de los muestreos

Especies	Muestreo				
	Septiembre 2016	Diciembre 2016	Abril 2017	Junio 2017	Septiembre 2017
<i>Brevundimonas vesicularis</i>	1	-	-	-	1
<i>Burkholderia cepacia</i>	-	-	1	1	1
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	1	1	-	-
<i>Alcaligenes denitrificans</i>	-	-	1	1	-
<i>Aeromonas salmonicida</i>	1	-	-	1	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1	1	1	1	1
<i>Weeksella virosa</i>	-	-	-	2	-
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	-	1	-	-	1
<i>Comamonas tetosteroni</i>	1	-	1	-	-
<i>Shewanella putrefaciens</i>	-	-	-	1	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	1	1
<i>Ralstonia pickettii</i>	-	-	-	2	-
Total	4	3	5	10	5

4. Resultados de aislamiento de bacterias potencialmente patógenas

En las muestras de agua recolectadas no se logró detectar la presencia de *Salmonella* spp. ni de *Staphylococcus* spp., al menos mediante las técnicas utilizadas en este estudio.

5. Resultados de indicadores de calidad sanitaria de los manantiales termales

En relación al valor promedio anual de los principales indicadores de calidad sanitaria determinados para la fuente termal La Musuy, municipio Rangel del estado Mérida (Tabla 47), los resultados obtenidos indican la presencia de bacterias aerobias mesófilas (BAM) en sólo una de las

muestras analizadas, correspondiente a una muestra tomada en el pozo ($9,7 \times 10^2$ UFC/mL).

A pesar de que en Venezuela no se cuenta con normativa legal de referencia en relación al límite de aerobios mesófilos permitidos en aguas minerales, y tomando como referencia valores de otros países, se considera que dicho valor es bastante elevado y por tal razón no sería conveniente utilizar las aguas del manantial para el tratamiento de dolencias por vía oral (ingesta del agua), debido a que los recuentos elevados de aerobios pueden ser indicativos de la presencia de posibles bacterias patógenas. Además, tal como se mencionó anteriormente, un recuento elevado puede asociarse a la disponibilidad de nutrientes para crecimiento microbiano de microbiota no patógena cuyos productos metabólicos podrían eventualmente ocasionar cambios en las características del ecosistema que favorezcan la presencia de microorganismos patógenos.

www.bdigital.ula.ve

Tabla 47.- Valor promedio anual de indicadores de calidad sanitaria obtenido para los manantiales termales de La Musuy

Muestra	BAM ^a (UFC/mL)	Coliformes Totales ^b (UFC/mL)	Coliformes Fecales ^c (UFC/mL)	Mohos y Levaduras ^d (UFC/mL)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ^e (UFC/mL)
NM1	< 1x10	$7,8 \times 10^2$	$9,3 \times 10^1$	< 1x10	< 1x10
PM1	$9,7 \times 10^2$	$1,6 \times 10^3$	$2,0 \times 10^2$	$3,0 \times 10^2$	1.0×10^1
NM2	< 1x10	$2,5 \times 10^1$	$1,5 \times 10^1$	< 1x10	< 1x10
PM2	< 1x10	$5,3 \times 10^1$	$3,0 \times 10^1$	$8,2 \times 10^1$	1.0×10^1

Temperatura de incubación: (a) 30°C, (b) 37°C, (c) 44.5°C, (d) 25°C, (e) 37°C

Por otra parte, en estas aguas se encontró una abundante proporción de coliformes en la totalidad de las muestras analizadas. Los coliformes totales resultaron con valores promedio entre $2,5 \times 10^1$ y $1,6 \times 10^3$ UFC/mL,

mientras que los coliformes fecales se encontraron entre $1,5 \times 10^1$ y $2,0 \times 10^2$ UFC/mL, lo cual es indicativo de la presencia de contaminación por materia fecal en las aguas, posiblemente debido a la cercanía de las zonas de pastoreo de ganado o a la poca protección ambiental que se le da a la fuente termal.

Además de esto, una de las principales causas de contaminación de los manantiales termales es la presencia de microorganismos alóctonos procedentes de las capas superiores del suelo, desde donde son vehiculizados por las aguas de infiltración que se mezclan con el agua de origen profundo o incluso pueden llegar al propio acuífero, razón por la cual no se descarta la incidencia de esta clase de microorganismos en el elevado recuento microbiano encontrado.

Estos resultados son similares a los encontrados por Burguera y col., (1983) en su trabajo de investigación pionero sobre las fuentes termales de La Musuy, quienes destacaron el elevado contenido de coliformes de los manantiales de Mucuchíes, reportando bacterias aerobias mesófilas (BAM) 1.3×10^2 UFC/mL, coliformes totales por el método del número más probable (NMP) mayor a 2400 NMP/100 mL, coliformes fecales de 460 NMP/100 mL y *Enterococcus* 43 NMP/100 mL. Dichos valores resaltan nuevamente el hecho de que las fuentes se encuentran contaminadas con materia de origen fecal.

En otro estudio similar, realizado por Dugarte (2015) sobre la calidad bacteriológica de las aguas termales de Tabay, municipio Santos Marquina del estado Mérida, se encontró que en dichas aguas termales se encuentran gran cantidad de Enterobacterias, inclusive se identificó la especie *Enterobacter Sakazakii* en tales fuentes, por lo que recomiendan la protección del manantial con el fin de mantener una calidad sanitaria adecuada.

Por el contrario, Niño y Peña (2013), quienes estudiaron la calidad microbiológica del agua de los manantiales termales del sector La Musuy,

municipio Rangel del estado Mérida, concluyeron que existe una escasa contaminación de dichas aguas en vista de que los indicadores de calidad sanitaria evaluados se encontraban dentro de los límites permitidos. En este sentido, los mencionados autores no indican la época del año en la que se realizó el estudio, ya que las condiciones de precipitación en la zona probablemente influyen en los resultados obtenidos en el recuento microbiano realizado en un momento en particular.

Respecto a la presencia de mohos y levaduras, tal como se observa en la tabla 47, en el presente trabajo de investigación no se detectó su presencia en ninguna de las muestras de agua provenientes de la naciente del manantial termal (NM1 y NM2), mientras que en ambas muestras del pozo de agua (PM1 y PM2) estuvieron presentes con valores promedio entre $8,2 \times 10^1$ y $3,0 \times 10^2$ UFC/mL. Además de esto, se logró detectar la presencia de *P. aeruginosa* en las muestras de agua provenientes del pozo (1.0×10^1 UFC/mL), siendo considerado este microorganismo un potencial patógeno para el hombre, cuya presencia es inaceptable en agua de consumo humano.

Según lo establecido en la Norma COVENIN 1431-82 para agua potable envasada (Fondonorma, 1982), la cual propone como límite máximo de coliformes totales permitido para agua mineral 10 UFC/100mL, las fuentes termales de La Musuy probablemente no se encuentran en óptimas condiciones sanitarias. Dicha norma también establece la ausencia de coliformes fecales como *Escherichia coli* y de patógenos como *P. aeruginosa*, para que el agua mineral envasada sea considerada potable. En este sentido, el agua de la fuente termal estudiada no puede ser considerada como potable, ya que se encontraron coliformes fecales en la totalidad de las muestras y presencia de *P. aeruginosa*, por ende dicha agua no es apta para el consumo humano.

De manera análoga, al comparar los resultados obtenidos con la normas de calidad para agua mineral envasada de España (BOE, 2011), la cual establece que en las nacientes de agua no deben existir parásitos ni microorganismos patógenos y que el contenido de *E. coli* y otros coliformes fecales, así como de enterococos fecales debe ser 0 por cada 250 mL de agua, lo que reafirma el hecho de que las aguas termales de La Musuy no deben ser ingeridas por los usuarios.

La mencionada norma española establece además, que la presencia de coliformes, estreptococos y clostridios en aguas mineromedicinales es indicativo de falta de protección de la captación del agua y considera más grave aún, la presencia de *E. coli*, *Salmonella* sp. o *P. aeruginosa* ya que esto supone un claro riesgo sanitario por tratarse de microorganismos patógenos. En esta normativa, tal como señala Rodés (2000) la detección de alguno de estos microorganismos en el agua obliga a tomar mejoras de carácter inmediato para su eliminación y de prevención para neutralizar las causas de la contaminación.

En el ámbito Suramericano, destaca la existencia en Colombia, de una normativa de calidad para el agua de los balnearios (MSPS, 2015), en la que a pesar de que establecen requisitos microbiológicos para las aguas de piscinas, afirman que el cumplimiento de dichos parámetros microbiológicos no serán exigibles a los estanques que almacenen aguas termales y de uso terapéutico. En otras palabras, al igual que en Venezuela, no existe una normativa específica de calidad para las aguas termales y por ende los usuarios de estos recintos están en situación de riesgo potencial al visitar estos sitios.

Por lo descrito anteriormente, es recomendable el uso de las fuentes termales La Musuy para el tratamiento de dolencias únicamente por vía externa (baños), considerándose que su uso por vía oral podría representar un riesgo para la salud, sobre todo en los grupos de riesgo, como son los niños, ancianos y personas inmunosuprimidas.

6. Resultados de los ensayos de resistencia antimicrobiana

En relación a los resultados de las pruebas de susceptibilidad/resistencia a antibióticos, tal como se mencionó anteriormente, ciertas especies poseen resistencia intrínseca a antibióticos razón por la cual cabría esperar distintos comportamientos de resistencia/sensibilidad frente a los antimicrobianos ensayados en el presente trabajo de investigación.

Los resultados de las pruebas realizadas a las cepas aisladas de las fuentes termales La Musuy mediante la prueba de difusión del disco (Método de Kirby Bauer) se resumen en la Tabla 48.

Tabla 48.- Resultados de los ensayos de resistencia/susceptibilidad frente a agentes antimicrobianos

Antimicrobiano	BV	BC	AH	AD	AS	PF	WV	PS	CT	SP	PA	RP
Acido nalidixico	S	R	I	I	I	S	S	S	S	S	S	S
Amikacina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
Amoxicilina-Ácido clavulánico	R	R	-	-	-	R	S	R	R	R	R	R
Ampicilina	R	-	R	-	-	-	S	R	-	S	R	-
Aztreonam	-	-	-	S	S	S	-	S	S	S	S	S
Cefotaxima	S	S	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ceftazidime	S	S	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-
Ciprofloxacina	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
Cloranfenicol	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eritromicina	-	-	-	R	R	-	-	-	-	-	-	-
Gentamicina	-	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
Imipenen	-	S	S	S	S	-	-	S	-	S	S	-
Meropenen	-	S	S	S	S	S	-	S	-	S	S	-
Netilmicina	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tigeciclina	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tobramicina	-	S	S	S	S	-	-	-	-	-	-	-
Trimetoprim-Sulfametoxazol	S	S	S	S	S	S	S	R	-	S	R	-

R= Resistente S= Sensible I= Intermedio

Especies: **BV:** *B. vesicularis*; **BC:** *B. cepacia*; **AH:** *A. hydrophila*; **AD:** *A. denitrificans* **AS:** *A. salmonicida*; **PF:** *P. fluorescens*; **WV:** *W. virosa*; **PS:** *P. stutzeri*; **CT:** *C. tetosteroni*; **SP:** *S. putrefaciens*; **PA:** *P. aeruginosa*; **RP:** *R. pickettii*

Como puede observarse en la tabla 47, de la totalidad de las especies bacterianas aisladas aproximadamente un 67% (8 especies) demostraron resistencia frente a amoxicilina ácido clavulánico. Este antimicrobiano posee como mecanismo de acción la inhibición de las proteínas de unión a penicilina (*del inglés* protein binding proteins, PBP) inhibiendo la síntesis de peptidoglicano en la formación de la pared celular bacteriana, ocasionando la muerte celular por lisis. La combinación con ácido clavulánico, el cual es un antibiótico betalactámico, impide la inactivación de la amoxicilina al evitar la ruptura ocasionada por las betalactamasas bacterianas.

Resalta el hecho de que este antimicrobiano es ampliamente utilizado para tratar infecciones respiratorias, óticas, urinarias, óseas, de la piel y tejidos blandos, razón por la cual, la presencia de especies bacterianas resistentes a su acción en una fuente termal natural es preocupante desde el punto de vista sanitario, ya que los bañistas podrían eventualmente adquirir infecciones causadas por microorganismos resistentes.

En un trabajo de investigación realizado por Flores (2014), se encontró que las especies *C. tetosteroni*, *S. putrefaciens* y diversas especies de *Pseudomonas* fueron resistentes a amoxicilina-ácido clavulánico. Dicho trabajo de investigación señala que esto se debe posiblemente a una mutación de los microorganismos inducida por la exposición al antimicrobiano durante el ensayo. Los bacilos gramnegativos no fermentadores tienen la capacidad de producir betalactamasas de tipo AmpC que son serin-betalactamasas de naturaleza cromosómica inducible, responsables de la resistencia habitual frente a aminopenicilinas inclusive combinadas con inhibidores de betalactamasa.

Por otra parte, la especie identificada como *B. vesicularis*, evidenció resistencia frente a la ampicilina, lo que coincide con antibiogramas de aislamientos de especies del género *Brevundimonas* realizados en estudios norteamericanos del Centro para Control de Enfermedades (CDC), en los que los miembros de dicho género muestran susceptibilidad a los

aminoglucósidos, con resistencia característica frente a ampicilina, así como susceptibilidad variable a penicilinas antipseudomonas y cefalosporinas de tercera generación (Flores, 2014).

Particularmente, la especie *Burkholderia cepacia* demostró resistencia frente al ácido nalidixico, amoxicilina-ácido clavulánico y al cloranfenicol., Vale la pena destacar la variedad de mecanismos de resistencia que posee *B. cepacia*, ya que a pesar de tratarse de una cepa aislada de una fuente de agua de origen natural, evidencia resistencia frente a tres clases de antibióticos que poseen mecanismos de acción diferentes.

El ácido nalidixico es un antibiótico de tipo quinolona, que interfiere en la síntesis de los ácidos nucleicos de la bacteria al unirse de manera irreversible a la enzima topoisomerasa, impidiendo por consiguiente la replicación, recombinación y reparación del ADN bacteriano. La Amoxicilina es un antibiótico β -lactámico de amplio espectro, especialmente activo contra bacterias gram negativas, cuyo mecanismo de acción consiste en la unión a las proteínas de unión a penicilina (PBP) y enzimas responsables de la síntesis de peptidoglicano, ocasionando de esta manera la formación de una pared celular defectuosa en las bacterias Gram negativas (Winn y col., 2008).

Por su parte, el ácido clavulánico, como se describió inicialmente, es un compuesto inhibidor de la acción de las enzimas β -lactamasas, las cuales son producidas por las bacterias de manera natural y son capaces de romper los compuestos químicos de tipo β -lactámico tales como la Amoxicilina, es decir que administrados en conjunto con este compuesto ejercen un efecto protector del mismo evitando su degradación por parte del microorganismo. De manera similar, el Cloranfenicol es un antibiótico bacteriostático que impide la síntesis de proteínas bacterianas al unirse a la subunidad ribosomal 50s, evitando la formación del enlace peptídico (Winn y col., 2008).

En este sentido, queda evidenciado como la especie *B. cepacia* realmente posee determinantes genéticos particulares que le confieren resistencia frente a una amplia gama de antibióticos, razón por la cual se

hace necesario el control sanitario adecuado de las fuentes termales para evitar la adquisición de posibles infecciones por este microorganismo.

Por su parte la especie *Aeromonas hydrophila* aislada de las fuentes termales La Musuy, resultó ser resistente únicamente a la Ampicilina, la cual al igual que la Amoxicilina es un antibiótico β -lactámico de amplio espectro, ampliamente utilizado en infecciones por bacterias gramnegativas. La resistencia mostrada por estas dos especies aisladas frente a los antibióticos ensayados podría atribuirse sin duda a determinantes genéticos, ya que se trata de microorganismos aislados de fuentes naturales en las que se presume no ha habido un contacto previo con agentes quimioterápicos y por ende no debería haberse desarrollado algún mecanismo de resistencia por parte de la cepa frente a tales agentes.

En relación a las especies de *Pseudomonas* aisladas en este estudio, *P. fluorescens*, *P. stutzeri* y *P. aeruginosa* destaca la resistencia que evidenciaron frente a distintos antimicrobianos. Esta multiresistencia coincide con los hallazgos de Andueza y col., (2015), quienes estudiaron la resistencia antimicrobiana en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de aguas termales de la provincia de Chimborazo, en Ecuador, utilizando la prueba de difusión del disco encontraron quince cepas de *P. aeruginosa* resistentes a los antibióticos Ampicilina y Ampicilina-Sulbactam, mientras que cinco de estas quince cepas fueron resistentes adicionalmente a Amikacina, Ceftazidime, Cefepime y Ciprofloxacina, por lo que sugieren realizar estudios acerca de los genes de resistencia que pudieran estar presentes en estas bacterias. Esto demuestra la amplia diseminación de genes de resistencia en los ecosistemas naturales.

Particularmente, la especie *Pseudomonas aeruginosa* presenta una marcada resistencia intrínseca a ciertos antibióticos y es capaz de adquirir resistencias adicionales mediante mutaciones. Esto se atribuye a las características de su membrana externa, integrada por bombas de expulsión

activas capaces de expulsar fuera de la célula bacteriana antibióticos tipo betalactámicos, tetraciclinas, cloranfenicol, macrólidos, fluoroquinolonas, sulfonamidas y trimetropim (Madigan y col., 2004).

Por otra parte, Albarrán y Araujo (2013) realizaron un trabajo de investigación sobre la microbiota presente en los tapetes microbianos de las aguas termales de Santa Apolonia del estado Mérida, en el cual identificaron bacterias del género *Pseudomonas*, a las que se les realizó la prueba de susceptibilidad a antibióticos mediante la técnica de difusión con discos frente a los antibióticos Aztreonam, Ceftazidima, Cefotaxima, Cefepime, Ciprofloxacina, Gentamicina e Imipenem.

En el mencionado trabajo los autores concluyeron que en los tapetes microbianos analizados la totalidad de los microorganismos aislados resultaron sensibles a la totalidad de los antibióticos ensayados. En este sentido, cabe destacar que probablemente la población bacteriana presente en el tapete podría presentar características diferentes a la población microbiana presente en las aguas termales propiamente dichas, ya que estas se encuentran sometidas en mayor proporción a la intervención del hombre.

Respecto a aislamientos de microorganismos resistentes a antimicrobianos en agua mineral, Manaia y col., (1990), estudiaron distintas marcas de aguas embotelladas ensayando la susceptibilidad de aislados bacterianos frente a amoxicilina, aztreonam, ácido nalidíxico, ciprofloxacina, gentamicina, amikacina y piperacilina. Los resultados evidenciaron la presencia de especies de *Comamonas testosteroni* cuyo comportamiento fue variable según su procedencia. Las cepas aisladas de la muestra de agua NB1 fueron resistente a todos los antibióticos ensayados, mientras que las cepas aisladas de otras marcas sólo fueron resistentes a aztreonam, ampicilina y ácido nalidíxico.

De manera similar, De Giglio y col., (2016) lograron aislar ciento veinte cepas bacterianas provenientes de aguas subterráneas al sur de Italia,

ensayando entre otros parámetros la actividad susceptibilidad antimicrobiana. Entre las especies aisladas se encontraron predominantemente *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Burkholderia cepacia*, observando que cerca del 80% de los aislados presentaron resistencia a los antibióticos ampicilina, gentamicina, amikacina y ácido nalidíxico, inclusive un 55% de las cepas aisladas resultaron ser multiresistentes.

Según Flores (2014), al comparar los resultados de los antibiogramas de cepas aisladas en diversos manantiales termales con lo establecido en la literatura para cepas aisladas en muestras clínica, se puede observar una variabilidad en el comportamiento de los bacilos gramnegativos no fermentadores frente a los antibióticos comúnmente utilizados en los laboratorios clínicos. Resulta difícil establecer una relación ambiente-resistencia antimicrobiana de los aislados de aguas subterráneas, minerales y superficiales, debido a que el ambiente puede influenciar la variabilidad genética de las bacterias, induciendo la aparición de diferentes mecanismos de resistencia.

7. Resultados de las pruebas de actividad biológica

En relación a la producción de enzimas amilasas, celulasas, lipasas y proteasas por los microorganismos aislados de los manantiales termales La Musuy, se obtuvo como resultado que en estos manantiales existen distintas proporciones de bacterias heterótrofas productoras principalmente de proteasas, seguido de productoras de amilasas. Existe una muy baja proporción de microorganismos lipolíticos y no se logró detectar la presencia de bacterias capaces de degradar celulosa.

Respecto a los microorganismos amilolíticos, en la tabla 49 se evidencia el recuento obtenido a los largo de los diferentes muestreos realizados, cuyos valores oscilaron entre <3 y 23 NMP/100 mL de agua

termal. Esta clase de microorganismos se observaron en casi todos los muestreos realizados a excepción de los meses septiembre y diciembre 2016, siendo el valor más alto correspondiente al mes de junio 2017.

Las enzimas amilolíticas son catalizadores bioquímicos de la hidrólisis de almidones, siendo uno de los principales productos del metabolismo microbiano de las bacterias amilolíticas. Como se describió anteriormente, las amilasas son enzimas de interés industrial con gran variedad de aplicaciones en la industria del papel, textil y de alimentos entre otras.

Tabla 49.- Recuento de microorganismos amilolíticos aislados de las fuentes termales La Musuy (NMP/100 mL) durante los muestreos

Muestra	Septiembre 2016	Diciembre 2016	Abril 2017	Junio 2017	Septiembre 2017
NM1	<3.0	<3.0	3.6	13.0	0.7
NM2	<3.0	<3.0	4.2	11.0	<3.0
PM1	<3.0	<3.0	11.0	23.0	4.2
PM2	<3.0	<3.0	9.2	21.0	<3.0

Las tres clases principales de enzimas amilolíticas son la alfa-amilasa, glucoamilasa y pululanasa, las cuales son producidas por microorganismos de diferentes taxas y géneros. Sin embargo los principales productores de enzimas comerciales se restringen sólo a un grupo de microorganismos, por ejemplo, las alfa-amilasas utilizadas en la transformación del almidón en dextrinas mediante licuefacción a altas temperaturas son producidas por bacterias termotolerantes del género *Bacillus* y también por algunos géneros de hongos como *Aspergillus*, *Penicillium* y *Mucor* (Obeidat y col 2012; Littlechild, 2015).

En el presente trabajo de investigación, las especies identificadas como productoras de amilasas aisladas de los manantiales La Musuy fueron

Brevundimonas vesicularis, *Pseudomonas stutzeri* y *Aeromonas hydrophila*. Particularmente, las especies *P. stutzeri* y *A. hydrophila* como productoras de amilasas coincide con los resultados de un trabajo de investigación realizado por Andueza (2006), quien además de esta especie, logró aislar e identificar como bacterias amilolíticas provenientes de aguas termales de Jaraba, en España, a la especie *Sphingomonas paucimobilis* y otras bacterias de los géneros *Bacillus*, *Enterobacter* y *Micrococcus*.

En un estudio similar en aguas termales venezolanas, ubicadas en la localidad de Santa Apolonia en el estado Mérida, Flores (2014) identificó las especies *B. cepacia* y *P. fluorescens*, las cuales resultaron capaces de hidrolizar el almidón presente en los medios de cultivos ensayados experimentalmente, evidenciando su capacidad de producir enzimas amilolíticas. Adicionalmente, tales especies demostraron actividad inhibidora del crecimiento del hongo *Aspergillus niger*, actividad antibacteriana contra bacterias gramnegativas y grampositivas, así como actividad enzimática proteolítica, resaltando el valor potencial de estos microorganismos como productores de sustancias de interés biotecnológico.

Aunque no se evidenció actividad celulolítica en los aislados de las fuentes termales La Musuy, en otros estudios en aguas termales se han encontrado bacterias productoras de celulasas. Tal es el caso del trabajo de investigación realizado por Viviano y col., (2010), quienes estudiaron las aguas termales de Las Trincheras, en el estado Carabobo, Venezuela, reportando el aislamiento de dos cepas bacterianas termófilas moderadas identificadas como *Geobacillus stearothermophilus* y *Brevibacillus brevis*, ambas con actividad celulolítica, razón por la cual valdría la pena continuar estudiando la bioactividad de especies aisladas en las fuentes termales de La Musuy.

En cuanto a la actividad lipolítica ensayada en el presente estudio, se utilizó la técnica de recuento en placa de agar tributirina, ensayando cada una de las especies previamente identificadas con el objetivo de evidenciar la

aparición de halos claros iridiscentes indicativos de la producción de lipasas. En este particular, las enzimas lipolíticas son biocatalizadores que efectúan reacciones de síntesis, hidrólisis o intercambios de grupos en sustancias de naturaleza oleosa y que han sido ampliamente utilizadas en la producción de alimentos, en la industria química y farmacéutica, así como en la degradación de desechos de naturaleza aceitosa.

En cuanto a los resultados de esta ensayo, resalta el hecho de que la única especie identificada en las fuentes termales de La Musuy que demostró actividad lipasa fue *Burkholderia cepacia*, lo que coincide con los resultados obtenidos por Bueno y col., (2015), quienes estudiaron la actividad lipasa de esta especie bajo diversas condiciones, demostrando que su óptimo de crecimiento y por ende la mayor actividad enzimática se obtuvo a 37°C, al igual que resultó en el presente trabajo de investigación y además de esto, que dicha especie es capaz de hidrolizar los triacilgliceroles presentes en los efluentes de una planta procesadora de papas fritas, incrementándose su actividad enzimática en condiciones alcalinas. Esta clase de estudios demuestran el gran potencial industrial de los metabolitos microbianos, por lo que es recomendable continuar con la investigación acerca de las actividades biológicas de los aislados de las fuentes termales de La Musuy.

En los manantiales hipertermales de Taptapani, localizadas en Odisha, India, se han efectuado diferentes estudios relacionados a la búsqueda de metabolitos bacterianos. Kumar y col., (2014), aislaron e identificaron en las fuentes de Taptapani las especies *Bacillus barbaricus*, *Aeromonas veronii* y *Stenotrophomonas maltophilia*, las cuales resultaron productoras de amilasas de especial interés debido a su posible estabilidad bajo condiciones acidas. Tales enzimas, incrementan la solubilidad del almidón, disminuyen la viscosidad, limitan la presencia de contaminantes microbianos y reducen el tiempo de reacción.

Otro estudio realizado en las fuentes de Taptapani fue llevado a cabo por Satpal y Panda (2011), quienes aislaron tres bacterias termófilas productoras de lipasa (denominadas AK-P1, AK-P2 y AK-P3). Las lipasas extracelulares procedentes del sobrenadante de cultivo libre de células bacterianas fueron ensayadas por los investigadores en una mezcla de aceite de oliva y se compararon sus actividades lipolíticas, resultando que la cepa AK-P3 identificada como *Porphyrobacter* sp. exhibió la actividad lipolítica más alta (5,5 U / mL). Las cepas AK-P1 y AK-P2 identificadas como *Acinetobacter* sp. y *Brevibacillus* spp. también demostraron actividades lipolíticas (4.5 U / mL y 3.5 U / mL respectivamente).

Respecto a la actividad proteolítica, en las fuentes termales estudiadas, se encontraron en mayor proporción los microorganismos proteolíticos, cuyos recuentos promedio variaron entre <3 y 40.8 NMP/100 mL de agua termal, según se evidencia en la tabla 50.

Tabla 50.- Recuento de microorganismos proteolíticos aislados de las fuentes termales La Musuy (NMP/100 mL) durante los muestreos

Muestra	Septiembre 2016	Diciembre 2016	Abril 2017	Junio 2017	Septiembre 2017
NM1	<3.0	<3.0	20.0	12.0	<3.0
NM2	4.2	<3.0	21.0	13.4	3.2
PM1	6.0	15.0	38.1	40.8	6.1
PM2	9.2	13.4	26.3	38.1	10.4

Las enzimas proteolíticas o proteasas son un grupo de enzimas que descomponen la cadena larga que forma las proteínas en fragmentos cortos llamados péptidos. Se distinguen dos clases de estas enzimas, las peptidasas y las proteinasas. Las peptidasas son capaces de actuar sobre los enlaces peptídicos de los extremos de la cadena y pueden ser

aminopeptidasas o carboxipeptidasas. Las proteinasas o endopeptidasas rompen los enlaces internos (Obeidat y col., 2012).

Las especies productoras de proteasas identificadas en las fuentes termales de La Musuy fueron *Brevundimonas vesicularis*, *Burkholderia cepacia*, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas aeruginosa*. Además de esto, se evidencia también en la tabla 48 que los mayores recuentos de bacterias proteolíticas corresponden a los meses de abril y junio 2017.

Estos resultados se corresponden con los aislamientos realizados por Andueza (2006), quien identificó las siguientes especies de bacterias proteolíticas en aguas termales españolas: *Aeromonas hydrophila*, *Brevibacterium spp*, *Brevundimonas vesicularis*, *Burkholderia cepacia*, *Enterobacter sakazakii*, *Kocuria varians*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Stenotrophomonas maltophilia* y *Sphingomonas paucimobilis*.

De manera general, puede afirmarse que de las doce especies identificadas en las fuentes termales de La Musuy, al menos seis especies (50%) tienen potencial para futuros estudios biotecnológicos. De estas especies aproximadamente el 33% demostraron actividad amilasa, el 56% presentaron actividad proteasa y sólo el 11% evidenció la producción de lipasa (Figura 8).

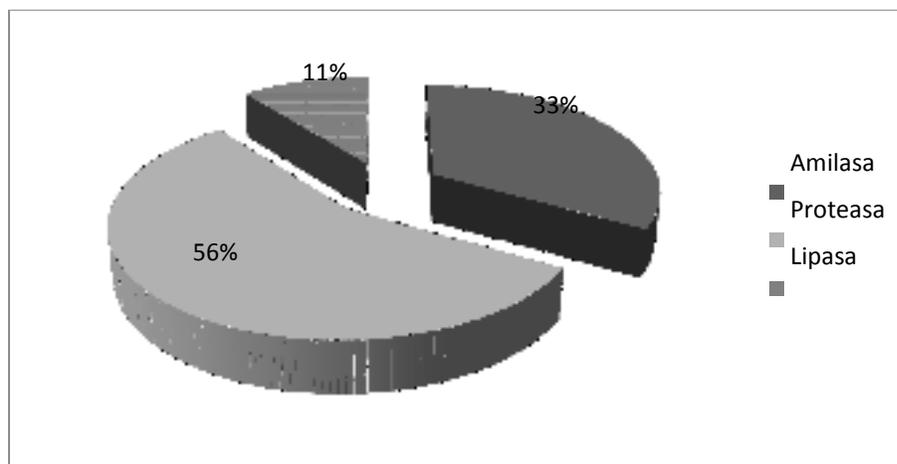


Figura 8.-Distribución porcentual de especies con actividad biológica aisladas de las fuentes termales La Musuy

En un estudio realizado por Mohammad y col., (2017), quienes efectuaron el aislamiento y caracterización de bacterias termofílicas a partir de aguas termales en Jordania, los investigadores identificaron mediante secuenciación de la subunidad 16S ARNr las especies *Bacillus licheniformis* y *Thermomonas hydrothermalis*, las cuales resultaron productoras de enzimas amilasa, proteasa, celulasa y lecitinasa. Por su parte, Seguí (2016) realizó un estudio de investigación comparativo de la diversidad microbiana de 21 manantiales hipertermales en España encontrando microorganismos proteolíticos, amilolíticos y amonificantes, pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* (81%), *Bacillus* (76%), *Staphylococcus* (67%), *Celullomonas* (57%), *Micrococcus* (52%), *Enterobacter* (52%), lo que refuerza el hecho de que el género *Pseudomonas* se encuentra ampliamente distribuido en aguas termales y algunas especies evidencian distintas clases de bioactividad.

Por su parte, Aanniz y col., (2015), investigaron la diversidad de bacterias termofílicas en distintos ambientes extremos (aguas termales, marismas salinas y desiertos) en Marruecos (África). La secuenciación de la 16S rRNA permitió identificar que la mayoría de los aislados pertenecían al

género *Bacillus* (97,5%) y una pequeña proporción al género *Aeribacillus*. Del total de cepas aisladas los investigadores encontraron las siguientes actividades enzimáticas: Amilolítica (71,25%), Proteolítica (50,41%) y Celulolítica (5,41%), demostrando la importancia de los manantiales termales como fuente de metabolitos bioactivos.

Otros estudios similares, sobre bioactividad de microorganismos aislados de manantiales termales que se han realizado en Venezuela, incluye el trabajo de investigación efectuado por Álvarez (2015), quien estudió la actividad biológica de microorganismos aislados de los manantiales termales de Jají en el estado Mérida, aislando en total quince cepas que demostraron actividad inhibitoria frente al crecimiento de las bacterias *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli* DH5 α , *Escherichia coli* DH5 α /PUC19.

En el mencionado trabajo, se encontró además, que cinco de las cepas aisladas poseían actividad antifúngica frente a *Candida albicans* y dos de ellas demostraron actividad proteasa debido a la producción de halos caseolíticos. Por otra parte, todos los aislados obtenidos en dicho trabajo fueron capaces de crecer a altas concentraciones de plomo (7000 $\mu\text{g/mL}$) y resultaron altamente tóxicos en cuanto a su letalidad frente a *Artemia salina*. Es decir, que en el mencionado estudio, al igual que en cinco de los aislados provenientes de la fuente termal de La Musuy se demostró la actividad proteasa, además de otras actividades que valdría la pena ensayar en futuras investigaciones.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMEDACIONES

Conclusiones

Las fuentes termales de La Musuy, ubicadas en el municipio Rangel del estado Mérida se consideran aguas mesotermales ya que poseen una temperatura promedio media entre 30-34°C, un pH entre 8-9 y una conductividad de 502-530 Ohmio/cm, asociada a su contenido de minerales producto de su origen.

Los manantiales termales de La Musuy albergan un número bajo de bacterias heterótrofas aerobias viables por debajo de 23 UFC/mL, indicando que el perímetro de protección de estas fuentes es adecuado y existe poca contaminación asociada a actividad humana.

Se observaron variaciones de heterótrofos aerobios durante los muestreos realizados entre 2016-2017, obteniéndose los recuentos más elevados tanto en la naciente como en el pozo durante el mes de abril 2017, posiblemente atribuibles a mayor afluencia de usuarios y a la coincidencia con el período lluvioso en Venezuela.

El ensayo de diferentes medios de cultivo y temperaturas de incubación para el recuento de heterótrofos viables evidenció una mayor recuperación de microorganismos en el medio de cultivo R2A y a la temperatura de incubación de 37°C.

En las fuentes termales La Musuy se aislaron treinta cepas de bacterias heterótrofas, de las cuales se identificaron el 90%. La totalidad de las cepas identificadas corresponden a bacilos gramnegativos, de los cuales el 75% son fermentadores y el 25% no fermentadores.

Se identificaron en total nueve géneros y doce especies provenientes de las fuentes termales La Musuy: *Brevundimonas vesicularis*, *Burkholderia cepacia*, *Aeromonas hydrophila*, *Alcaligenes denitrificans*, *Aeromonas salmonicida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Weeksella virosa*, *Pseudomonas stutzeri*, *Comamonas tetosteroni*, *Shewanella putrefaciens*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Ralstonia pickettii*.

En las fuentes estudiadas se encontró la especie *Aeromonas salmonicida*, siendo la primera vez que se reporta esta especie en aguas termales de la región.

www.bdigital.ula.ve

No se detectó la presencia de los microorganismos potencialmente patógenos pertenecientes al género *Salmonella* ni tampoco la especie *Staphylococcus aureus* en las fuentes termales estudiadas.

En las aguas termales de La Musuy se encontró presencia de coliformes totales con valores promedio entre $2,5 \times 10^1$ y $1,6 \times 10^3$ UFC/mL, mientras que los coliformes fecales se encontraron entre $1,5 \times 10^1$ y $2,0 \times 10^2$ UFC/mL, indicativo de la presencia de contaminación por materia fecal en las aguas.

Se detectó la presencia de *P. aeruginosa* en muestras de agua termal provenientes del pozo ($1,0 \times 10^1$ UFC/mL), siendo considerado este microorganismo un potencial patógeno para el hombre, cuya presencia es inaceptable en agua de consumo humano.

Todas las especies bacterianas aisladas de las fuentes termales La Musuy evidenciaron resistencia a antibióticos. La especie *Burkholderia cepacia* y las especies del género *Pseudomonas* demostraron resistencia múltiple frente a más de un antibiótico.

Las especies *B. vesicularis*, *B. cepacia* y *A. hydrophila*, *P. fluorescens* y *P. aeruginosa*, demostraron actividad proteasa, siendo esta la actividad biológica evidenciada en mayor proporción entre los aislados. Los recuentos promedio de microorganismos proteolíticos variaron entre <3 y 40.8 NMP/100 mL, obteniéndose los valores más altos en abril y junio 2017.

Sólo la especie *B. cepacia* demostró poseer actividad lipolítica frente a la tributirina.

No se evidenció actividad celulolítica en los aislados de las fuentes termales de La Musuy.

Las especies *B. vesicularis*, *A. hydrophila* y *P. stutzeri* evidenciaron actividad amilolítica en presencia de almidón. El recuento de microorganismos amilolíticos a lo largo de los diferentes muestreos realizados varió entre <3 y 23 NMP/100 mL, obteniéndose el mayor valor en junio 2017.

Recomendaciones

Se recomienda en futuras investigaciones en las fuentes termales La Musuy, repetir los muestreos durante los meses seleccionados en este estudio a fin de comprobar las variaciones observadas en la población microbiana.

Medir los parámetros fisicoquímicos tanto del agua termal como del ambiente en cada muestreo a fin de evaluar su asociación con posibles variaciones en la microbiota encontrada.

Examinar bajo el microscopio en fresco una muestra del agua termal a fin de evidenciar posible presencia de protozoarios.

Estudiar el pozo inferior de las fuentes termales de La Musuy a fin de comparar su calidad sanitaria, perfil bacteriano y bioactividad de las especies respecto a lo obtenido en el pozo superior.

Confirmar la identificación de las especies aisladas de las fuentes termales de La Musuy mediante el uso de herramientas de Biología molecular.

Proponer estándares de calidad de las aguas termales que constituyan un aporte para la elaboración de una norma COVENIN referente a aguas termales, dada la abundancia de las mismas en el territorio nacional.

BIBLIOGRAFIA

- Aanniz T., Ouadghiri M., Melloul M., Swings J., Elfahime E., Ibjibijen J., Ismaili M., Amar M. (2015). Thermophilic bacteria in Moroccan hot springs, salt marshes and desert soils. **Brazilian Journal of Microbiology** 46(2), 443-453. Brazil.
- Ablin, J., Hauser, W., Buskila, D. (2013). Spa Treatment (Balneotherapy) for Fibromyalgia: A Qualitative-Narrative Review and a Historical Perspective. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 1-5. England.
- Alarcón, F. y Correa, W. (2009). **Aislamiento y caracterización de microorganismos termófilos presentes en la fuente termal de aguas calientes Estado Táchira**. Tesis de Licenciatura no publicada. Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.
- Albarrán, M. y Araujo, L. (2013). **Estudio de la microbiota presente en los tapetes microbianos de las aguas termales de Santa Apolonia, Municipio Tulio Febres Cordero, Estado Mérida-Venezuela**. Tesis de Licenciatura no publicada. Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.
- Álvarez, J. (2015). **Estudio de microorganismos con actividades biológicas procedentes de manantiales de aguas termales de Jají en el Estado Mérida**. Tesis de Maestría no publicada. Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.
- Andueza, F., Albuja, A., Arguelles, P., Escobar, S., Espinoza, C., Araque, J. y Medina, G. (2015). "Resistencia antimicrobiana en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de aguas termales de la provincia de Chimborazo, Ecuador". **Anales de la Real Academia de Farmacia**, 81(2), 158-163. España.

Andueza, F. (2007). **Diversidad microbiana de las aguas mineromedicinales de los Balnearios de Jaraba, España.** Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, España.

Andueza F. (2006). **Diversidad Microbiana de las aguas mineromedicinales de los balnearios de Jaraba.** Tesis Doctoral. Universidad complutense de Madrid, Madrid, España.

Andueza, F. (2003). **Bacterias heterótrofas en manantiales termales.** Trabajo de ascenso no publicado. Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

Arias L., rheinho M., San Martín J. (1995). Concepto de Termalidad y Aguas minerales. **Boletín Sociedad Española Hidrología médica**, 2: 93-100. España

Armijo M., San Martín J. (1994). **Curas balnearias y Climáticas. Talasoterapia y Helioterapia.** España: Editorial Complutense.

www.bdigital.ula.ve

Avendaño, A. (2016). **Calidad Microbiológica de un Agua Termal.** Tesis de Maestría no Publicada. Escuela Colombiana de Ingeniería Julio Garavito.

Badoei-Dalfard A. (2016). L-asparaginase production in the *Pseudomonas pseudoalcaligenes* strain JHS-71 isolated from Jooshan Hot-spring. **Molecular Biology Research Communications**, 5(1):1-10. United States.

Barrow, G. y Feltham, R. (2003). **Manual para la Identificación de Bacterias de Importancia Médica.** (Segunda edición). México: Editorial Continental, S.A.

Benítez, J., Mostue M., López, M. (2015). Estudio Físicoquímico e isotópico de aguas termales del municipio Libertador del estado Sucre, Venezuela. **Saber Revista Multidisciplinaria del Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente** 27(1): 94-101. Venezuela.

BOE Boletín Oficial del Estado (2011). Boletín oficial del estado Número 16 Sección I Páginas 6111-6133 del 19 de enero de 2011. Disponible: <https://www.boe.es/boe/dias/2011/01/19/pdfs/BOE-A-2011-971.pdf>. [Consulta 2017, Enero 26]

Borja J., Zavaleta, A., Izaguirre, V. (2012). Bacterias halotolerantes productoras de hidrolasas aisladas de aguas termales de Tarapoto-Perú. **Ciencia e Investigación** 15(2): 66-70. México.

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. United Kingdom.

Bueno, P., De Oliveira, T., Castiglioni, G., Junior, M. and Ulhoa, C. (2015). Application of lipase from *Burkholderia cepacia* in the degradation of agro-industrial effluent. **Water Science and Technology**, 71(7): 957-964. United States.

www.bdigital.ula.ve

Burguera, J., Burguera, M., Millán, F., García, R., Odreman, O. y Sampol, M. (1980). **Estudio de las fuentes termales del Estado Mérida**. Facultad de Ciencias Forestales, Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.

Burguera, J., Burguera, M., Andressen, R. y Sampol, M. (1983). **Aguas termales en el Estado Mérida**. Facultad de Ciencias Forestales, Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.

Cabral, J. (2010). Water Microbiology. Bacterial Pathogens and Water. International. **Journal of Environmental Research and Public Health** 7, 3657-3703. Estados Unidos.

Chamorro, J. y Caballero, C. (2006). Efectos de las Aguas mineromedicinales. Crisis Termales. Efectos Secundarios y Respuestas Anormales. Disponible: <http://gesdoc.isciii.es/gesdoccontroller?action=do> [Consulta 2015, Agosto 22]

- Clardy, J., Fischbach, M., Walsh, W. (2006). New antibiotics from bacterial natural products. **Nature Biotechnology**, 24(12), 1541-1550. Belgium.
- Cuellar, M., Delgado, Y. y Rincón, M. (2007). **Aislamiento y caracterización de microorganismos termófilos de fuentes termales del municipio Ayacucho del Estado Táchira**. Tesis de Licenciatura no publicada. Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.
- Contoli, M.; Gnesini, G., Forini, G., Marku, B., Pauletti, A., Padovani, A., Casolari, P., Taurino, L., Ferraro, A., Chicca, M., Ciaccia, A., Papi, A., Pinamonti S. (2013). Reducing Agents Decrease the Oxidative Burst and Improve Clinical Outcomes in COPD Patients: A Randomised Controlled Trial on the Effects of Sulphurous Thermal Water Inhalation. **The Scientific World Journal**, 1-7. United States.
- De Castro, M., Rodríguez-Belmonte, E., and González-Siso, M. (2016). Metagenomics of Thermophiles with a Focus on Discovery of Novel Thermozyms. **Frontiers in Microbiology**, 7:1521-1529. United States.
- De Giglio, O., Barbuti, G., Trerotoli, P., Brigida, S., Calabrese, A., Di Vittorio, G., Lovero, G., Caggiano, G., Uricchio, V., Montagna, M. (2016). Microbiological and hydrogeological assessment of groundwater in southern Italy. **Environmental Monitoring and Assessment**, 188(11): 638-646. Italy.
- De la Rosa, M., Pintado, C., Rodríguez, C., Mosso, M. (2009). Microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario de Alicúm de las Torres. **Anales de la Real Academia de Farmacia**, 75(1), 763-780. España.
- De la Rosa, M. y Mosso, M. (2000). **Diversidad microbiana de las aguas termales**. En: Panorama actual de las aguas minerales y mineromedicinales en España. ITGE. Madrid, 153-158 pp.
- De la Rosa, M. y Mosso, M. (1995). **Diversidad Microbiana de las Aguas Minerales Termales**. Departamento de Microbiología II. Facultad de Farmacia de La Universidad Complutense de Madrid. Disponible: horus.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/. [Consulta: 2015, Agosto 22]

- Dugarte, M. (2015). **Calidad bacteriológica de las aguas termales de Tabay, Municipio Santos Marquina Mérida Estado Mérida**. Tesis de Licenciatura no publicada. Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.
- Duque, G. (2003). **Manual de geología para ingenieros**. Universidad Nacional de Manizales, Colombia, 407-409 pp.
- Egas, C. y Tinajero, M. (2016). **Aislamiento de microorganismos capaces de producir antibióticos a partir de suelos de las regiones naturales de Ecuador**. Tesis de Licenciatura no publicada. Universidad Politécnica Salesiana Sede Quito. Quito, Ecuador.
- Farias, P., Espírito Santo C., Branco, R., Francisco, R., Santos, S., Hansen, L., Sorensen, S., and Morais, P. (2015). Natural Hot Spots for Gain of Multiple Resistances: Arsenic and Antibiotic Resistances in Heterotrophic, Aerobic Bacteria from Marine Hydrothermal Vent Fields. **Applied and Environmental Microbiology**, 81(7): 2534–2543. England.
- Ferguson, R., Buckley, E. and Palumbo, A. (1984). Response of marine bacterioplankton to differential centrifugation and confinement. **Applied and Environmental Microbiology**, 47, 49-55. United States.
- Ferrer, M. (2005). Metagenoma: acceso a los recursos potencialmente ilimitados de microorganismos no cultivables. Temas de Actualidad del Instituto de Catálisis y Petroleoquímica Madrid. Disponible: http://www.semicrobiologia.org/SEM38_11.pdf. [Consulta: 2013, Enero 21]
- Flores, S. (2014). **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**. Tesis de Maestría no publicada. Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.
- Fondonorma. (1982). **Norma COVENIN 1431-82 Agua Potable Envasada. Requisitos**. Comisión Venezolana de Normas Industriales. Ministerio de Fomento. Caracas, Venezuela.

Forbes, B; Sahm, D. y Weissfeld, A. (2004). **Bailey & Scott Diagnóstico Microbiológico**. Buenos Aires: Médico Panamericana.

Ghilamicael A., Budambula N., Anami S., Mehari T., Boga I. (2017). Evaluation of prokaryotic diversity of five hot springs in Eritrea. **BMC Microbiology**, 17, 203-213. Kenya.

Govan, J. and Deretic, V. (1996). Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 60(3), 539-574. United States.

Guamán, E. (2019). **Evaluación de la microbiota y resistencia a antibióticos en las aguas termales Ojo de fantasma, en la comunidad Pungal de Puela del Cantón Penipe de la provincia de Chimborazo**. Tesis de Licenciatura no publicada. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba, Ecuador.

www.bdigital.ula.ve

Gualpa, S. (2016). **Estudio microbiológico de las aguas termales del balneario Cununyacu ubicado en las faldas noroccidentales del cerro Ilaló de la parroquia Tumbaco perteneciente a la provincia de Pichincha**. Tesis de Licenciatura no publicada. Escuela Politécnica Superior de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.

Grant, W. y Log, P. (1989). **Microbiología Ambiental**. Zaragoza: Acribia, S.A.

Hoppe, H. (1978). Relationships between active bacteria and heterotrophic potential in the sea. **Netherlands Journal of sea research** 12, 78-98. Netherlands.

Jardine, J., Luther King, A., Mavumengwana, V., Ubomba-Jaswa, E. (2017). Phylogenetic Analysis and Antimicrobial Profiles of Cultured Emerging Opportunistic Pathogens (Phyla Actinobacteria and Proteobacteria) Identified in Hot Springs. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, 14, 1070-1088, Switzerland.

Kanokratana, P., Chanapan, S., Pootanakit, K and Eurwilaichitr, L. (2004). Diversity and abundance of Bacteria and Archaea in the Bor Khlueng Hot Spring in Thailand. **Journal Basic Microbiology** 44(6), 430-444. United States.

Kumar S., Sangeeta R., Soumya S., Ranjan P., Bandyopadhyay, B. and Kumar Das Mohapatra P. (2014). Characterizing Novel Thermophilic Amylase Producing Bacteria from Taptapani Hot Spring, Odisha, India. **Jundishapur Journal of Microbiology**, 7(12): 1-7. India.

Keller, S., Konig, V., Mosges, R. (2014). Thermal Water Applications in the Treatment of Upper Respiratory Tract Diseases: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Journal of Allergy**, 1-17.

Lamoreaux P., Tanner J. (2001). **Spring and bottled waters of the world: ancient history, source, occurrence, quality and use**. Editorial Springer-Verlag: United States.

www.bdigital.ula.ve

Lagarto, A., y Bernal, I. (2002). Utilización terapéutica de las aguas y fangos mineromedicinales. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos. **Revista Cubana Farmacia**, 36(1), 57-69. Cuba.

Littlechild, J. (2015). Enzymes from Extreme Environments and Their Industrial Applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, 3:161-167. United States.

MacFaddin, J. (2004). **Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica**. (Tercera edición). Buenos Aires: Médica-Panamericana.

Magrone T., Galantino M., Di Bitonto N., Borraccino L., Chiaromonte G., Jirillo E. (2016). Effects of thermal water inhalation in chronic upper respiratory tract infections in elderly and young patients. **Immunity & Ageing**, 13-18. United States.

- Madigan, M., Martinko, J. y Parker, J. (2004). **Brock. Biología de los Microorganismos**. (Décima edición). Madrid: Pearson Educación, S.A.
- Manaia, C., Nunes, O., Morais, P. and Da Costa, M. (1990). Heterotrophic plate counts and the isolation of bacteria from mineral waters on selective and enrichment media. **Journal of Applied Microbiology**, 69(6), 871-876. United States.
- Manage, P., Kawabata, Z. and Nakano s. (2000). Algicidal effect of the bacterium *Alcaligenes denitrificans* on *Microcystis* spp. **Inter-Research Aquatic Microbial Ecology**, 22(2), 111-117. United States.
- Manogaran, M., Marnejon, T. and Sarac, E. (2004). Pneumonia and Sepsis Due to *Weeksella virosa* in an Immunocompromised Patient. **Infectious Disease in Clinical Practice**, 12(5), 285-287. United States.
- Martínez, F. (1970). **Aguas Termales de Venezuela**. Publicaciones del Rectorado. Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.
- Medina-Ramírez G., Naranjo C., Escobar S., Araque J., Djabayan P., Andueza F. (2017). Microbiota extremofila y resistomas ambientales de la fuente termal "Termas de la Merced" Quito-Ecuador. **FIGEMPA: Investigación y Desarrollo**, 2(7), 33-37. Ecuador.
- Mian E. y Mian M. (1992). Riferimenti dell'assorbimento cutaneo in medicina termale. Disponible:books.google.co.ve/books?isbn=88299169. [Consulta: 2015, Noviembre06]
- Mohammad, B., Al Daghistani, H., Jaouani, A., Abdel-Latif, S., Kennes, C. (2017). Isolation and Characterization of Thermophilic Bacteria from Jordanian Hot Springs: *Bacillus licheniformis* and *Thermomonas hydrothermalis* Isolates as Potential Producers of Thermostable Enzymes. **International Journal of Microbiology**, 1-12. London.
- Mohammed R., Mohammad B., Hamid S., Ziaedin S., Zahra E., Fatemeh M., Manizheh R., Ladan M., and Zaghian S. (2013). Isolation and

- characterization of novel thermophilic lipase-secreting bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, 44(4), 1113-1119. Brazil.
- Mokapatti, A. (2013). **Neonatal** sepsis due to *Weeksella virosa*. **International Journal of Research in Medical Sciences**, 1(3), 294-295. United States.
- Monasterio, A. (2008). Termas de Copahue. **Balnea** 4,151-153. España.
- Moufarrij S., Deghayli L., Raffoul W., Hirt-Burri N., Michetti M., de Buys Roessingh A., Norberg M., Applegate L. (2014). How important is hydrotherapy? Effects of dynamic action of hot spring water as a rehabilitative treatment for burn patients in Switzerland. **Annals of Burns and Fire Disasters**, 37(4), 184-191. England.
- Mosso, M., Beltrán, M., Rodríguez, C. y De La Rosa, M. (2006). Microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario Cervantes. **Anales de la Real Academia de Farmacia** 72,285-304. España.
- MSPS Ministerio de Salud y Protección Social (2015). Decreto 0554 del 27 de Marzo de 2015. Disponible: <http://wp.presidencia.gov.co/sitios/no.pdf> [Consulta: 2016, Diciembre 16]
- 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. India.
- 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.
- Niño, R. y Peña, C. (2013). **Calidad microbiológica del agua de manantiales de aguas minerales termales del sector La Musuy, Municipio Rangel del Estado Mérida**. Tesis de Licenciatura no publicada. Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.

- 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. Africa.
- Oderiz, S., Palau, M., Del palacio, P., Lewis, M., Bettiol, M., Martina, p., Bosch, A., Yantorno, O. y Gatti, B. (2011). Evaluación de los sistemas comerciales automatizados VITEK 2 y API 20NE para la identificación de organismos del complejo *Burkholderia cepacia* aislados de muestras clínicas. **Revista Argentina Microbiología**, 43(3), 212-217. Buenos Aires.
- Ortega, M. (2015). **Efectos de la balneoterapia con aguas mineromedicinales sobre la salud**. Tesis de Doctorado no publicada. Universidad de Zaragoza, Zaragoza, España.
- Pallavi, P., Jain, R., Mahajan G. (2011). Anti-infective potential of hot-spring bacteria. **Journal of Global Infectious Diseases**, 3(3), 241-245. United States.
- Perevalova, A., Kolganova, T., Birkeland, N., Schléper, C., Bronch-Osmolovskaya, E. and Lebedinsky, A. (2008). Distribution of Crenarchaeota representatives in terrestrial hot springs of Russia and Iceland. **Applied Environmental Microbiology**, 74, 7620–7628. United States.
- Porter, R. (1990). The medical history of waters and spas. **Medical History Supply** 10, vii-xii. United States.
- Posada, Y., Pachón, L., Agudelo, A., Álvarez, Y., Díaz, C., Fardeau, M., Jouliau, 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. Colombia.
- Prescott, L., Harley, J. and Klein, D. (2002). **Microbiology**. 6th edition. Mc Graw-Hill.

- Ramírez, A., García, E., Longa, A., Sánchez, K., Nieves, M., Araque, M. y Mosqueda, N. (2006). **Manual práctico de bacteriología general**. Publicaciones del Vicerrectorado Académico CODEPRE. Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.
- Reina, J., Gil, J. Salva, F., Gómez, J. and Alomar, P. (1990). Microbiological Characteristics of *Weeksella virosa* (Formerly CDC Group If) Isolated from the Human Genitourinary Tract. **Journal of Clinical Microbiology**, 28(10), 2357-2359. United States.
- Rheinheimer, G. (1987). **Microbiología de las aguas**. Zaragoza: Acribia, S.A.
- Rodier, J. (1998). **Análisis de las aguas. Aguas naturales, aguas residuales, agua de mar**. Tercera edición. España: Editorial Omega.
- Rodés, O. (2000). Panorama actual de las aguas minerales y minero-medicinales en España. Disponible: <http://aguas.igme.es/igme/> Consulta: 2015, Agosto [15]
- Rondón, E. y Villafranca, K. (2012). **Microbiota bacteriana heterótrofa viable cultivable de las aguas termales del sector aguas calientes de Tabay Estado Mérida**. Tesis de Licenciatura no publicada. Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.
- Ruiz, C. (2016). **Perfil microbiológico (hongos y bacterias) de la lluvia horizontal en la región del salto del Tequendama y su relación con la contaminación ambiental local**. Tesis de Licenciatura no publicada. Universidad Nacional abierta y a Distancia. Bogotá, Colombia.
- Rubiano, C. (2006). **Aislamiento y Caracterización de Microorganismos Termofílicos anaerobios lipolíticos, proteolíticos y amilolíticos de manantiales Termominerales de Paipa e Iza (Boyacá)**. Tesis de pregrado de microbiología industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de ciencias departamento de microbiología. Bogotá D.C. Disponible: www.javeriana.edu.co/biblos/.../tesis249. [Consulta: 2015, Agosto 26]

- Sahay, H., Yadav, A., Singh, A., Singh, S., Kaushik, R. and Saxena, A. (2017). Hot springs of Indian Himalayas: potential sources of microbial diversity and thermostable hydrolytic enzymes. **3 Biotech**, 7, 118-129. India.
- Saikia, R., Gogoi, D., Mazumder, S., Yadav, A., Sarma, R., Bora, T., Gogoi, B. (2012). *Brevibacillus lacterosporus* strain BPM3, a potential biocontrol agent isolated from a natural hot water spring of Assam, India. **Microbiological Research**, 166, 216-225. United States.
- Sarmiento, F., Peralta, R. and Blamey, J. (2015). Cold and Hot Extremozymes: Industrial Relevance and Current Trends. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, 3, 148-154. United States.
- Satpal, B. and Panda, A. (2011). Biochemical Characterization and 16S rRNA Sequencing of Few Lipase-Producing Thermophilic Bacteria from Taptapani Hot Water Spring, Orissa, India. **Biotechnology Research International**, 1-5. United States.
- Shell, C., Sparo, M., De Luca, M., Grenóvero, S., De Michele, D. Giancomino, M., Monasterio, A., Belderrain, A., Basualdo, J. (2011). 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. Argentina.
- Seguí, M. (2016). **Agua mineromedicinales hipertermales. Salud, diversidad microbiana y control de calidad.** Trabajo Fin de Grado no publicado. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España.
- Souza V., Espinosa-Asuar L., Escalante A.E., Eguiarte L.E., Farmer J., Forney L., Lloret L., Rodríguez-Martínez J.M., Soberón X., Dirzo R. y Elser J.J. (2006). An endangered oasis of aquatic microbial biodiversity in the Chihuahuan desert. **Proceedings of The National Academy of Sciences**, 103(17), 6565-6570. United States.
- Talavera, A. (2019). **Biodiversidad microbiana de las aguas termales del balneario Cununyacu y sus posibles propiedades Biotecnológicas.**

Proyecto de investigación para la obtención del Título de Ingeniera Ambiental. Universidad Central del Ecuador, Quito.

Thorolfsson, B. and Thor, V. (2013). Microbiological Analysis in Three Diverse Natural Geothermal Bathing Pools in Iceland. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, 10(3), 1085-1099. England.

Trabelsi L., Mnari A., Abdel-Daim M., Abid-Essafi S., Aleya L. (2016). Therapeutic properties in Tunisian hot springs: first evidence of phenolic compounds in the cyanobacterium *Leptolyngbya* sp. biomass, capsular polysaccharides and releasing polysaccharides. **BMC Complementary and Alternative Medicine** 16, 515-525. Francia.

Urbani, F. (1991). Ubicación y composición química de las aguas termales de Venezuela. **Geotermia**, 10, 1-75. México.

Urbani, F., Hernández, D. y Sánchez, S. (2004). Referencias Geotérmicas de Venezuela Desde el siglo XVI hasta el año 2004. **Cieos UCV**, 37, 51p. Venezuela.

Urmenta, J., Navarrete, A. y Sancho, J. (2000). Isolation and identification of autochthonous microbiota from a granitic aquifer and its variation after the bottling process. **Current Microbiology**, 41, 379-383. United States.

Valero, M. (2016). **Aguas mineromedicinales extremadamente duras: salud y diversidad microbiana**. Tesis de grado no publicada. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.

Valbuena O., Pereira J., Daza R., González F., Hernández A., Mora M., Morales G, Medina L. (2010). Actividades sulforeductora y desulfurizadora en bacterias termófilas aisladas de lodos hidrotermales de las Trincheras, Venezuela. **Interciencia**, 35(6), 414-420. Venezuela.

Viviano, F., Medina, L., Ramos, N., Amaíz, L., Valbuena, O. (2010). Degradación de celulosa por bacterias de aguas termales de Las Trincheras, Venezuela. **Revista Latinoamericana Biotecnología Ambiental Algal**, 2(1), 18-29. México.

Winn, W., Allen, S., Janda, W., Koneman, E., Procop, G., Schreckenberger, P. and Woods, G. (2008). **Koneman Diagnóstico Microbiológico**. Sexta edición. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.

www.bdigital.ula.ve