

Artículo original

Especies de *Pseudomonas* y sus perfiles de resistencia a los antibióticos en ecosistemas acuáticos del Ecuador.

Pseudomonas species and their profiles of resistance to antibiotics in aquatic ecosystems of Ecuador.

Andueza Felix^{1,5*}, Araque Judith¹, Acuña Jessica¹, Escobar Jessica¹, González Marco¹, Escobar Sandra², González-Romero Ana Carolina³, Medina Gerardo^{4,5}.

¹FIGEMPA. Universidad Central del Ecuador. Quito. CP-170521. Ecuador. ²Carrera de Bioquímica y Farmacia. Facultad de Ciencias. Escuela Superior Politécnica del Chimborazo. Riobamba. CP-060155. Ecuador. ³Carrera de Laboratorio Clínico. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Nacional del Chimborazo. Riobamba. CP- 060108. Ecuador. ⁴Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Regional Autónoma de los Andes. Ambato. CP- 100105. Ecuador. ⁵Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes. Mérida. CP-5101. Venezuela.

Recibido: febrero de 2023–Aceptado: abril de 2023

RESUMEN

La presencia de bacterias resistentes a los antibióticos en el ambiente es un problema que se ha venido estudiando en los últimos años. Sin embargo, no siempre es el resultado del uso indiscriminado de estas sustancias en diversas actividades humanas, sino que puede obedecer a mecanismos naturales de adaptación, sobrevivencia y evolución que han desarrollado algunas especies bacterianas a lo largo del tiempo. El objetivo del presente trabajo fue conocer la biodiversidad de especies del género *Pseudomonas* y sus perfiles de resistencia a antibióticos en cepas aisladas del agua de lagos cratericos volcánicos y manantiales de aguas mineromedicinales del Ecuador. Se analizaron un total de 32 muestras de agua del lago Quilotoa y 12 muestras de agua de balnearios mineromedicinales ecuatorianos. El aislamiento de las especies de *Pseudomonas* se realizó por la técnica de filtración en membrana, utilizando un volumen de muestra de 100 mL y el agar Cetrimide. Las cepas aisladas se identificaron siguiendo los esquemas de MacFaddin, complementadas con las pruebas bioquímicas de

las galerías Microgen. El perfil de resistencia a los antibióticos se determinó por el método de difusión en placas de Kirby y Bauer interpretándose según el manual CLSI. Se identificaron 16 cepas de seis especies del género *Pseudomonas*. La mayoría de las cepas resultaron resistentes y multiresistentes a los antibióticos ensayados. Los resultados señalan que los ecosistemas acuáticos pueden ser un reservorio importante de genes y de bacterias resistentes a los antibióticos que deben ser estudiados y monitoreados.

PALABRAS CLAVES

Ecosistemas acuáticos, lagos volcánicos, manantiales mineromedicinales, *Pseudomonas*, resistencia a antibióticos.

ABSTRACT

The presence of bacteria resistant to antibiotics in the environment is a problem that has been studied in recent years. However, it is not always the result of the indiscriminate use of these substances in various human activities, but it can be due to natural mechanisms of adaptation, survival,

and evolution that some bacterial species have developed over time. The objective of the present work was to know the biodiversity of species of the genus *Pseudomonas* and their antibiotic resistance profiles in strains isolated from the water of volcanic crater lakes and mineralmedicinal hot springs of Ecuador. A total of 32 water samples from Lake Quiltoa and 12 water samples from spas were analyzed. The isolation of *Pseudomonas* species was carried out by the membrane filtration technique, using a sample volume of 100 mL and Cetrimide agar. The isolated strains were identified following the schemes of MacFaddin, complemented with the biochemical tests of the Microgen galleries. The antibiotic resistance profile was determined by the plate diffusion method of Kirby and Bauer, interpreted according to the CLSI. 16 strains of six species of the genus *Pseudomonas* were identified. Most of the strains were resistant and multi-resistant to the antibiotics tested. The results indicate that water from extreme environments can be an important reservoir of genes and bacteria resistant to antibiotics that must be studied and monitored.

KEY WORDS

Aquatic ecosystems, mineralmedicinal hot springs water, *Pseudomonas*, resistance to antibiotics, volcanic lake.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la presencia de bacterias resistentes a los antibióticos y los mecanismos de resistencia involucrados se han transformado en una importante área de estudio y en un problema mundial dada sus repercusiones sanitarias y económicas [1, 2].

El uso no regulado, de antibióticos en medicina humana y veterinaria, así como en la agricultura y en la producción de algunos alimentos, ha generado un peligroso aumento de bacterias resistentes a antibióticos en el ambiente, creando un problema emergente de salud pública [3].

Estudios realizados en años recientes en una variedad de ecosistemas acuáticos y terrestres, como glaciares, lagos antárticos, lagos cratericos,

desiertos, fumarolas en los fondos marinos y en manantiales de aguas termales, han puesto en evidencia la presencia de una gran diversidad de microorganismos, muchos de los cuales eran desconocidos para la ciencia, y presentan diversos patrones de resistencias naturales a diferentes tipos de antibióticos, incluidos antibióticos de última generación [4-8].

Este hecho se ha atribuido a procesos de competencia entre los microorganismo productores de antibióticos que han habitado estos ecosistemas desde hace miles de años, y los microorganismos que no lo producen, los cuales han tenido que ir adaptándose, a través de mutaciones e intercambios genéticos, produciendo diversos tipos de mecanismos de resistencia a estas sustancias, a fin de poder sobrevivir [9-12].

Unido a los hallazgos descritos, se encuentra el hecho de que, en la actualidad, la mayoría de los antibióticos se excretan sin modificaciones, lo que ha incrementado el impacto potencial de los residuos de antibióticos en el medio ambiente, los cuales pudieran ejercer una presión selectiva adicional sobre los microorganismos que lo habitan, transformándolos en nuevos nichos o reservorios de determinantes de resistencia a antimicrobianos, lo que ha recibido el nombre de resistomas ambientales [13].

Entre los microorganismos Gram negativos, con amplia distribución en el ambiente, se encuentran diversas especies de *Pseudomonas*. Estas especies han demostrado poseer la capacidad de adaptarse rápidamente a condiciones desfavorables tales como altas concentraciones de sales, alta radiaciones UV, oligotrofias, valores extremos en el pH y la temperatura, así como a la presión ejercida por la presencia de diversos tipos de microorganismos productores de sustancias antimicrobianas, adquiriendo en este último caso, determinantes de resistencia que permite inactivarlos, alterar el sitio blanco de acción de los antibióticos, modificar su pared celular o sobre expresar sistemas de eflujo [14-15].

En este sentido, el objetivo del presente trabajo fue conocer la biodiversidad de especies del género *Pseudomonas* y sus perfiles de resistencia a antibióticos en ecosistemas acuáticos, como lo son el agua de los lagos cratericos volcánicos y el agua

de los manantiales de aguas mineromedicinales del Ecuador.

MATERIALES Y MÉTODOS

Toma de las muestras: Se realizaron dos campañas de muestreos en el lago craterico volcánico Quilotoa, ubicado a 3914 m.s.n.m. en la Provincia de Cotopaxi, a 32 km oeste-noroeste de la ciudad de Latacunga y a 83 km al suroeste de Quito, formando parte de la reserva ecológica “Los Ilinizas” [16].

En el caso de los manantiales de agua mineromedicinales, se analizaron 12 muestras provenientes de los sitios de emergencia del agua, como de las piscinas utilizadas por los bañistas, de cada uno de los siguientes balnearios:

El primer manantial de agua mineromedicinal estudiado fue el balneario “Piscinas El Cachaco”, que se encuentra en un complejo turístico ubicado en la parroquia de Calacalí en la provincia de Pichincha, en el Distrito Metropolitano de Quito a una altura de 2839 m.s.n.m. [17]. El balneario cuenta con una piscina de agua termal.

De igual forma, se analizaron las fuentes de aguas mineromedicinales del balneario “El Tingo” que se encuentran ubicadas en Sangolquí, parroquia Alangasí zona del Valle de Los Chillos en la provincia de Pichincha, al oriente de Quito a una altura de 2500 m.s.n.m. [18a]. El balneario consta de tres piscinas que se surten de manantiales de agua tipo hipertermal y bicarbonatadas sódicas que poseen una temperatura promedio de 43,8 °C.

Por último, se investigaron las aguas mineromedicinales del balneario Urauco ubicado en la parroquia Lloa, perteneciente a la ciudad de Quito, provincia de Pichincha a una altitud de 2773 m.s.n.m. en las faldas del volcán Guagua Pichincha [18b]. El balneario de Urauco tiene dos depósitos, el uno forma un manantial natural y el otro una piscina termal con el punto de surgencia del agua termal en el centro de la piscina.

En el caso de las muestras del agua del lago craterico Quilotoa, se tomaron un total de 32 muestras de un volumen de un litro cada una, recolectadas en recipientes estériles, en dos ocasiones durante el año 2021. Las muestras de agua se recolectaron en ocho sitios seleccionados a

lo largo y ancho de la laguna a nivel de la superficie. Se identificaron las coordenadas geográficas de los sitios de recolección mediante un GPS (Garmin eTrex20).

Para las muestras de agua en los balnearios de agua mineromedicinal estudiados, se tomaron en la naciente y la piscina termal, de manera aseptica, dos muestras de 500 mL de agua, recolectadas en recipientes estériles, en dos ocasiones durante el año 2021

En todos los casos, las muestras se trasladaron a temperatura ambiente en una cava hasta el laboratorio, realizándose los análisis microbiológicos dentro de las 24 horas luego de la toma [19, 20].

Aislamiento de cepas bacterianas de *Pseudomonas* presentes en muestras de aguas de ambientes extremos de Ecuador: Se utilizó la técnica de filtración en membrana, filtrando un volumen de 100 mL de muestra de agua y utilizando filtros de 0,45 µm los cuales se colocaron sobre la superficie del agar Cetrimide y se incubaron a 30 °C durante un tiempo máximo de siete días. Finalizado el tiempo de incubación se aislaron y purificaron las colonias crecidas en agar Soja Tripticasa para su posterior identificación [21].

Identificaciones taxonómicas de las colonias de *Pseudomonas* aisladas: Se realizaron tinciones de Gram y pruebas bioquímicas de acuerdo con los esquemas de MacFaddin (2003) [22], complementadas con las contenidas en el kit comercial de identificación bacteriana Microgen (2007). Se consideró una buena identificación cuando los porcentajes de probabilidad de identificación arrojados por el software de Microgen fueron mayor al 75% [23].

Las cepas bacterianas aisladas se clasificaron siguiendo los criterios taxonómicos del Manual de Bergey [24] y la nomenclatura del Comité Internacional de Sistemática Bacteriana (ICSB) y publicadas en el Internacional Journal of Systematic Bacteriology.

Determinación del perfil de susceptibilidad a los antibióticos de las cepas de *Pseudomonas* aisladas e identificadas: Se utilizó el método de difusión en agar de acuerdo con la técnica Kirby y Bauer (1966) [25]. Se tomaron 200 µL de una suspensión de cada una de las cepas de

Pseudomonas identificadas, equivalente al McFarland 0,5, y se mezclaron con 100 mL de agar Mueller Hinton. Se depositaron 25 mL de cada una de las mezclas en diferentes placas de Petri estériles y una vez solidificado el agar, se colocaron sobre su superficie discos de los siguientes antibióticos: Amikacina® (AMK 30 µg), Ampicilina® (AMP 10 µg), Ciprofloxacina® (CIP 5 µg), Cloranfenicol® (CLO 30 µg), Gentamicina® (GEN 10 µg), Imipenen® (IMI 10 µg) y Trimetroprim/Sulfametoxazol® (TRI/SUL 25 µg). La selección de antibióticos se realizó de acuerdo con lo recomendado por el CLSI (2019) [26]. Se incubaron durante 24 a 96 horas a 37°C., ello considerando que las cepas bacterianas de origen ambiental generalmente muestran un crecimiento lento en comparación con las cepas bacterianas de origen clínico.

Una vez finalizada la incubación se llevó a cabo la lectura e interpretación de los resultados. Se utilizaron como cepas de control positivo y negativo, las cepas de referencia de *Escherichia coli* ATCC 25922 y de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. La prueba se interpretó de acuerdo con las recomendaciones del CLSI (2019) [26].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al observar los datos que se exponen en la Tabla 1, se puede indicar que, en todos los balnearios de aguas mineromedicinales estudiados, así como en el agua del lago craterico volcánico Quilotoa, se pudo detectar la presencia de cepas de diferentes especies del género *Pseudomonas*, siendo la especie *Pseudomonas aeruginosa* la de mayor frecuencia de aislamiento, seguida de la especie *Pseudomonas alcaligenes*.

TABLA 1.
Especies de bacterias del género *Pseudomonas* y sus perfiles de resistencia a los antibióticos aisladas en ecosistemas acuáticos del Ecuador

Lugar	Especie de <i>Pseudomonas</i> aisladas e identificadas	Código	AMK (10 µg)	AMP (10 µg)	CIP (5 µg)	CLO (5 µg)	GEN (10 µg)	IMI (10 µg)	T/S (25 µg)
Balneario El Cachaco	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BCPAE 1	R	R	S	R	R	R	S
	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	BCPAL 1	S	R	S	S	R	S	S
	<i>Pseudomonas. spp</i>	BCPSS 1	R	R	S	R	R	R	S
Balneario El Tingo	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BTPAE 1	R	R	S	R	R	R	S
	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	BTPAL 1	R	R	S	S	R	R	S
	<i>Pseudomonas. fluorescens</i>	BTPFL 1	S	R	S	S	R	S	S
	<i>Pseudomonas. spp</i>	BTPSS 1	S	R	R	R	R	R	R
Balneario Urauco	<i>Pseudomonas. aeruginosa</i>	BUPAE 1	R	R	S	R	R	R	S
	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	BUPAL 1	R	R	S	S	R	R	S
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	BUPFL 1	S	R	S	S	R	S	S
	<i>Pseudomonas spp</i>	BUPSS 1	R	R	S	R	R	R	R
Lago Craterico Quilotoa	<i>Pseudomonas. alcaligenes</i>	LQPAL1	S	R	S	S	R	S	S
	<i>Pseudomonas. fluorescens</i>	LQPFL1	S	R	S	S	R	S	S
	<i>Pseudomonas. putida</i>	LQPPU1	R	R	S	S	R	S	R
	<i>Pseudomonas. spp</i>	LOPSS 1	R	R	S	R	R	R	R
	<i>Pseudomonas. stutzeri</i>	LOPST 1	S	S	S	S	S	S	S

NOTA: **AMK:** Amikacina®, 30 µg. **AMP:** Ampicilina®, 10 µg. **CIP:** Ciprofloxacina®, 5 µg. **CLO:** Cloranfenicol®, 30 µg. **GEN:** Gentamicina®, 10 µg. **IMI:** Imipenen®, 10 µg. **T/S:** Trimetroprim/Sulfametoxazol®, 25 µg. R: Resistente. S: Sensible

La presencia de distintas especies del género *Pseudomonas* en las aguas mineromedicinales termales y las aguas de lagos volcánicos, es un fenómeno que se ha estado observando desde hace años, donde este género bacteriano, gracias a su amplia capacidad metabólica y enzimática, puede sobrevivir y desarrollarse, así como cumplir diversas funciones ecológicas en estos ecosistemas [15, 17, 18a, 18b, 27-29].

Los resultados obtenidos en cuanto a la diversidad de especies de *Pseudomonas* aisladas en las aguas mineromedicinales son similares a los resultados obtenidos por otros autores en diferentes partes del mundo [27, 29].

En el caso del agua de los lagos cratericos, aunque existen muy pocos estudios microbiológicos de cultivo dependiente, en varios lagos ha sido posible detectar la presencia de especies de *Pseudomonas* en sus aguas y sedimentos, coincidiendo en este sentido con los resultados obtenidos en el trabajo para el agua del lago Quilotoa [15, 28].

De igual forma, los estudios microbiológicos metagenómicos, independientes del cultivo, realizados en las aguas de lagos cratericos volcánicos, han puesto de manifiesto la presencia de una variada microbiota, compuesta por bacterias de los grupos de *Gamma* proteobacterias, *Delta* proteobacterias, *Beta* proteobacterias y Firmicutes, entre los cuales destaca la presencia de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* y familias relacionadas con este último género, lo cual hace necesario una mayor investigación para poder caracterizar esta población bacteriana [30, 31].

Algunas de las especies de *Pseudomonas* aisladas en este trabajo, como *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas alcaligenes* y *Pseudomonas putida*, también han sido detectadas por otros autores en aguas mineromedicinales y minerales naturales [21, 32].

Con relación a los perfiles de resistencia a los antibióticos de las especies de *Pseudomonas* aisladas e identificadas, los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 1. Al respecto se puede señalar que todas las especies resultaron resistentes a por lo menos dos antibióticos, excepto una cepa de *Pseudomonas stutzeri* aislada del agua de lago

volcánico Quilotoa que resultó sensible a todos los antibióticos ensayados.

Las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas en el agua mineromedicinal de los balnearios estudiados, resultaron todas sensibles a los antibióticos Ciprofloxacina[®] y Trimetoprim/Sulfametoxazol[®]. Por otra parte, todas las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* ensayadas fueron resistente como mínimo a cuatro antibióticos (Amikacina[®], Ampicilina[®], Cloranfenicol[®] y Gentamicina[®]), lo que indica la presencia mayoritaria de multiresistencia en esta especie de *Pseudomonas* (Tabla 1).

La presencia de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes y multiresistentes a una variedad de antibióticos, en diferentes tipos de ecosistemas acuáticos, ha sido indicado por diversos investigadores [14, 15, 29, 31-34].

Los resultados obtenidos con los perfiles de susceptibilidad de las cepas de *Pseudomonas alcaligenes* aisladas, tanto de las aguas mineromedicinales como del agua del lago Quilotoa, indican que todas las cepas analizadas de esta especie resultaron sensibles a los antibióticos Ciprofloxacina[®], Cloranfenicol[®] y Trimetoprim/Sulfametoxazol[®], resultando por otra parte, resistentes a por lo menos dos antibióticos (Ampicilina[®] y Gentamicina[®]) y siendo la mayoría multiresistentes a tres antibióticos (Tabla 1)

Cepas de la especie *Pseudomonas alcaligenes* resistentes y multiresistentes se han aislado también en diversos tipos de aguas mineromedicinales por investigadores en diversos países, resultados coincidentes con los obtenidos en este trabajo [21, 29, 33].

Con relación a las cepas de *Pseudomonas fluorescens* estudiadas, todas las cepas resultaron sensibles a los antibióticos Amikacina[®] Ciprofloxacina[®], Cloranfenicol[®] y Trimetoprim/Sulfametoxazol[®] y a su vez, todas mostraron resistencia a los antibióticos Ampicilina[®] y Gentamicina[®] (Tabla 1).

Algunos investigadores han referido el aislamiento de cepas de *Pseudomonas fluorescens* en muestras de aguas minerales naturales, entre ellas, las aguas mineromedicinales, lo cual coincide con los resultados obtenidos en el presente trabajo [27, 33].

La cepa de la especie *Pseudomonas putida*, aisladas en el agua del lago Quilotoa, mostró sensibilidad a tres antibióticos, Ciprofloxacina®, Cloranfenicol® e Imipenem®, y resultó resistente a cuatro antibióticos Amikacina®, Ampicilina®, gentamicina® y Trimetoprim/Sulfametoxazol®, resultando multiresistente (Tabla 1).

Al igual que la mayoría de cepas del género *Pseudomonas*, cepas de la especie *Pseudomonas putida* se han aislado de diferentes tipos de ecosistemas acuáticos [27, 33]. Sin embargo, su presencia en agua de lagos cratericos no ha sido señalada

Diversos autores han demostrado la presencia de cepas bacterianas resistentes y multiresistentes a los antibióticos en las aguas mineromedicinales y minerales naturales, destacando entre ellas los miembros del género *Pseudomonas* [29, 32], lo que es de gran interés desde el punto de vista ecológico y evolutivo, dado a que se ha postulado que estos ecosistemas pudieran ser un reservorio de resistomas ambientales. De igual manera, su presencia tiene un interés sanitario, dado a que las aguas mineromedicinales son utilizadas por personas enfermas o con su sistema inmunológico comprometido pudiendo ello ser un factor de predisposición para infecciones resistentes a los tratamientos de estas personas [21].

Los análisis de secuencias en los genes de resistencia de cepas de *Pseudomonas* de origen clínico han revelado una estrecha relación con las especies de *Pseudomonas* de origen ambiental, lo que lleva a indicar el papel primordial que juega el medio ambiente en la diseminación de los genes responsables de estas características y que apunta a que se deben realizar estudios de vigilancia epidemiológica ambiental [35].

En cuanto a la presencia de especies de *Pseudomonas* resistentes a antibióticos en el agua del lago craterico Quilotoa, los resultados obtenidos evidencian su presencia en este ecosistema, siendo la primera vez que se reporta el aislamiento de bacterias de este género resistentes y multiresistentes a antibióticos en este lago volcánico craterico de Ecuador. La presencia de estos resistomas se podría deber a una presión selectiva por parte de microorganismos productores de antibióticos, que haría que las bacterias del género *Pseudomonas*, entre otras especies

bacterianas, buscaran su sobrevivencia y adaptación a través de mecanismos de resistencia a los antibióticos producidos por estos seres vivos, de manera que le dieran una mayor posibilidad de competencia y adaptación en este medio, construyendo de esta manera un nicho para miembros de este género bacteriano [36]. Por otra parte, no hay que descartar que la presencia de estas bacterias resistentes y multiresistentes sea también el reflejo de una contaminación antropogénica emergente, producto del intensivo turismo que se ha venido construyendo alrededor de este lago craterico volcánico [7, 10-13].

El incremento de la resistencia a antibióticos es un claro ejemplo del impacto que tiene la actividad humana sobre los ecosistemas. Los microorganismos resistentes se han difundido rápidamente en todo el mundo, exigiendo la implementación de medidas de detección y vigilancia en diferentes ámbitos, entre ellos el ambiente, tal y como lo postula la visión de “Una Salud o One Health” [3, 10, 12].

CONCLUSIONES

Los manantiales de aguas mineromedicinales termales de algunos balnearios del Ecuador, así como el agua del lago craterico volcánico Quilotoa tienen como parte de su microbiota bacteriana, diversas especies del género *Pseudomonas*, que se han adaptado a las condiciones fisicoquímicas y químicas específicas de estos ambientes y ha logrado sobrevivir en ellas creando un nicho ecológico. Así mismo, la mayoría de estas especies de *Pseudomonas* presentan perfiles de multiresistencia a diversos antibióticos, muchos de los cuales son empleados en la terapéutica para combatir diferentes infecciones bacterianas, lo cual hace que se deban incluir estos ecosistemas como fuentes de resistomas ambientales importantes que deben ser investigados y monitoreados epidemiológicamente, para consolidar el concepto de Una Sola Salud (One Health).

AGRADECIMIENTOS

El agradecimiento a la Dirección de Investigaciones de la Universidad Central del

Ecuador por facilitar los fondos económicos para el desarrollo del presente trabajo a través de los proyectos senior avanzados DI-2017-011, DI-2019-045 y DI-2022-045.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Ahmad KA. Global economic impact of antibiotic resistance: A review. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 2019; 19: 313-316.
- [2] Li-Guan L, Qi H, Xiaole Y, Tong Z. Source tracking of antibiotic resistance genes in the environment, Challenges, progress, and prospects. *Water Research*, 2020; 185: 1-12.
- [3] Dhingra S, Rahman NAA, Peile E, Rahman M, Sartelli M, Hassali MA, Islam T, Islam S, Haque M. Microbial Resistance Movements: An Overview of Global Public Health Threats Posed by Antimicrobial Resistance, and How Best to Counter. *Front. Public Health*. 2020; 8: 1-22. doi: 10.3389/fpubh.2020.535668.
- [4] Perry J, Waglechner N, Wright G. The Prehistory of Antibiotic Resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016; 6(6): 1-8.
- [5] Ishii S. Ecology of Pathogens and Antibiotic-resistant Bacteria in Environments: Challenges and Opportunities. *Microbes Environ*. 2019; 34(1): 1-4.
- [6] González M, Viteri F, Villacis L, Escobar J, Araujo L, González A, Medina G, Araque J, Andueza F. Perfiles de susceptibilidad a los antibióticos en cepas del género *Bacillus* aisladas de ambientes acuáticos extremos del Ecuador. *An. Real Acad. Farm*. 2021; 87 (1): 27-34.
- [7] Paun VI, Lavin P, Chifiriuc MC, Purcarea C. First report on antibiotic resistance and antimicrobial activity of bacterial isolates from 13,000-year old cave ice core. *Sci. Rep*. 2021; 11: 514. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79754-5>.
- [8] Yarzabal L, Buela L, Batista R. Climate change, melting cryosphere and frozen pathogens: Should we worry? *Environmental Sustainability*. 2021; 4: 489-501. <https://doi.org/10.1007/s42398-021-00184-8>.
- [9] Mullis M, Rambo I, Baker B, Kiel B. Diversity, Ecology, and Prevalence of Antimicrobials in Nature. *Front Microbiol*. 2019; 10: 1-23. Doi: 10.3389/fmicb.2019.02518.
- [10] Bottery MJ, Pitchford JW, Friman VP. Ecology and evolution of antimicrobial resistance in bacterial communities. *ISME J*. 2021; 15: 939-948. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-00832-7>
- [11] Letten AD, Hall AR, Levine JM. Using ecological coexistence theory to understand antibiotic resistance and microbial competition. *Nat. Ecol. Evol*. 2021; 5: 431-441. <https://doi.org/10.1038/s41559-020-01385-w>
- [12] Martins A & Rabinowitz P. The impact of antimicrobial resistance in the environment on public health. *Future Microbiology*. 2020; 15(9): 699-702.
- [13] Manaia CM, Graham D, Topp E, Martinez JL, Collignon P, Gaze WH. Antibiotic Resistance in the Environment: Expert Perspectives. In: Manaia, C., Donner, E., Vaz-Moreira, I., and Hong, P. (eds) *Antibiotic Resistance in the Environment. The Handbook of Environmental Chemistry, Volumen 91*, Springer, Cham. 2020. https://doi.org/10.1007/698_2020_472
- [14] Camiade M, Bodilis J, Chaftar N, Riah-Anglet W, Buquet J, Flores Ribeiro A, Pawlak B. Antibiotic resistance patterns of *Pseudomonas* spp. isolated from faecal wastes in the environment and contaminated surface water. *FEMS Microbiology Ecology*. 2020; 96(2):1-21. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiaa008>
- [15] Zemskaya T, Cabello-Yeves P, Pavlova O, Rodríguez-Valera F. Microorganisms of Lake Baikal the deepest and most ancient lake on Earth. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2020; 104: 6079-6090.
- [16] Orellana J. Volcán Quilotoa. Breve Resumen de su Historia, Geología y Actividad Eruptiva. Peligros Potenciales Asociados, Tríptico. Instituto Geofísico Escuela Politécnica Nacional. 2009. [Recuperado el día 26 de agosto del 2021]. Disponible en: www.igeppn.edu.ec/publicaciones-para-la-comunidad/comunidad-espanol/33-tríptico-Quilotoa-historia-peligros-y-sistema-de-nitreo

- [17] Andueza F, Jácome A, Cortez S, Medina G, Arciniegas S, Parra Y, Araque J. Microbiota of the thermal water of the spa "Piscinas El Cachaco", Calicali, Province of Pichincha, Ecuador. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*. 2018; 84(4): 247-254.
- [18a] Andueza F, Chaucala S, Vinueza R, Escobar S, Medina-Ramírez G, Araque J. Calidad microbiológica de las aguas termales del Balneario "El Tingo". Pichincha. Ecuador. *Revista Ars Pharmaceutica*. 2020; 61 (1):1-9. <http://dx.doi.org/10.30827/ars.v61i1.8378>.
- [18b] Andueza F, Araque J, Parra Y, Arciniegas S, Guaila R, Escobar S, Medina G. Diversidad bacteriana en aguas mineromedicinales del balneario "Urauco". Pichincha. Ecuador. *An. Real Acad. Farm.* 2020; 86 (1): 9 – 18. <http://dx.doi.org/10.15568/anranf.2020.89.or01>
- [19] INEN. Norma NTE INEN 2169:2013. Muestreo. Manejo y Conservación de Muestras. Instituto Ecuatoriano de Normalización 2169. Primera Edición. Quito-Ecuador. 2013.
- [20] INEN. Norma NTE INEN 2176. Agua. Calidad del Agua. Muestreo de técnicas de Muestreo. Instituto Ecuatoriano de Normalización 2176. Primera Edición. Quito-Ecuador. 2013.
- [21] Andueza F. Diversidad Microbiana de las aguas mineromedicinales de los balnearios de Jaraba. [Tesis Doctoral]. Madrid. Universidad Complutense de Madrid; 2007.
- [22] MacFaddin J. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Tercera edición. Editorial médica Panamericana. Buenos Aires. Argentina. 2004.
- [23] Microgen. Microgen GEN-A GEN-B system. Microgen Bioproducts. Camberley. UK. 2007.
- [24] Brenner D, Krieg N, Staley J. Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology. Volumen 2. Proteobacteria. Part B. Gamma proteobacteria. Second edition. Springer. USA. 2005.
- [25] Bauer AW, Kirby MM, Sherris JC, Truck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 1966; 45(4): 493-496.
- [26] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing Clinical and Laboratory Standards Institute Wayne, PA. 2019.
- [27] De la Rosa MC, Andueza F, Sánchez MC, Rodríguez MC, Mosso MA. Microbiología de las aguas mineromedicinales de los Balnearios de Jaraba. *An R Acad Nac Farm.* 2004;70: 521-542.
- [28] Manna S, Das B, Mohanty B, Bandopadhyay C, Das N, Baitha R, Kanti Das A. Exploration of heterotrophic bacterial diversity in sediments of the mud volcano in the Andaman and Nicobar Islands, India. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*. 2021; 16: 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2021.100465>.
- [29] Gutiérrez MG, Andueza F, Araque J, Lugo A, Chacón Z. Caracterización microbiológica y potencial biotecnológico de microorganismos aislados de las aguas termales de la Musuy, Municipio Rangel del Estado Mérida. Venezuela. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 2018; 38 (1): 27-32.
- [30] Dib J, Weiss A, Neumann A, Ordoñez O, Estevez M, Farias M. Isolation of bacteria from remote high altitude Andean lakes able to grow in the presence of antibiotics. *Recent Pat. Anti-infect. Drug Discov.* 2009;4: 66–76. Doi: 10.2174/157489109787236300.
- [31] Pérez MF, Kurth D, Farías ME, Soria MN, Castillo-Villamizar GA, Poehlein A, Daniel R, Dib JR. First Report on the Plasmidome From a High-Altitude Lake of the Andean Puna. *Frontiers in Microbiology* 2020; 11: 1-15.
- [32] Santana-Ramos M, Rueda-Furlan JP, Lage-Gallo IF, Rodríguez dos Santos LD, Amabile de Campos T, Savazzi-Guedes SE. High Level of Resistance to Antimicrobials and Heavy Metals in Multidrug-Resistant *Pseudomonas sp.* Isolated from Water Sources. *Current Microbiology*. 2020; 77: 2694–2701.
- [33] Kittinger C, Lipp M, Baumert R, Folli B, Koraimann G, Toplitsch D, Liebmann A, Grisold AJ, Farnleitner AH, Kirschner A, Zarfel G. Antibiotic resistance patterns of *Pseudomonas spp.* isolated from the river

Danube. Front. Microbiol. 2016; 7: 1-8.

[34] Nassri I, Tahri L, Saidi A, Ameer N, Fekhaoui M. Prevalence, diversity, and antimicrobial resistance of *Salmonella enteric* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates from spring water in a rural area of northwestern Morocco. Biodiversitas. 2021; 22: 1363-1370.

[35] Naze F, Jouen E, Randriamahazo R, Simac C, Laurent P, Bleriot A, Chiroleu F, Gagnevin L, Pruvost O, Michault A. *Pseudomonas aeruginosa* Outbreak Linked to Mineral Water Bottles in a Neonatal Intensive Care Unit: Fast Typing by Use of High-Resolution Melting Analysis of a Variable-Number Tandem-Repeat Locus. J. Clin. Microbiol. 2010; 48 (9): 3146-3.

[36]. Malard L A, Guisan A. Into the microbial niche. Trends in Ecology & Evolution. 2023; <https://doi.org/10.1016/j.tree.2023.04.015>

Andueza Leal Félix Daniel: Biólogo. Magister Scientiarum en Biología Molecular y Fermentaciones. DEA en Microbiología. Doctor en Microbiología. Profesor e investigador de Microbiología FIGEMPA. Universidad Central del Ecuador. Quito. CP170521. Ecuador. Profesor de Microbiología. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de los Andes. Mérida. CP 5101. Venezuela Correo electrónico: anduezalealfelix@gmail.com. **Orcid ID:** <https://orcid.org/0000-0002-9046-8883>

Judith Araque Rangel: Farmacéutica. Magister Scientiarum en Microbiología. Asistente de investigación. Laboratorio de Microbiología. FIGEMPA. Universidad Central del Ecuador. Quito. CP170521. Ecuador. **Orcid ID:** <https://orcid.org/0000-0002-6423-9622>

Jessica Acuña: Ingeniería ambiental. Ayudante de investigación. FIGEMPA. Universidad Central del

Ecuador. Quito. CP170521. Ecuador. **Orcid ID:** <https://orcid.org/0000-0001-5821-3429>

Jessica Escobar Freire: Ingeniería Ambiental. Ayudante de investigación. FIGEMPA. Universidad Central del Ecuador. Quito. CP170521. Ecuador. **Orcid ID:** <https://orcid.org/0000-0001-5935-9104>

Marco González Escudero: Odontólogo. Licenciado en Ciencias Sociales. Magister en Ciencias Sociales. Profesor metodología de la investigación. FIGEMPA. Universidad Central del Ecuador. Quito. CP170521. Ecuador. **Orcid ID:** <https://orcid.org/0000-0003-4415-6579>

Sandra Escobar Arrieta: Bioquímica Farmacéutica. Magister en Salud Pública. Doctora en Química de Medicamentos mención Biotecnología. Profesora de la carrera de Bioquímica y Farmacia. Facultad de Ciencias. Escuela Superior Politécnica del Chimborazo (ESPOCH). Riobamba. CP-060155. Ecuador. **Orcid ID:** <https://orcid.org/0000-0002-3347-0282>

Ana Carolina González Romero: Licenciada en Bioanálisis. Magister Scientiarum en Microbiología. Doctora en Ciencias Médicas Fundamentales. Profesora de la Carrera de Laboratorio Clínico. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Nacional del Chimborazo. Riobamba. CP- 060108. Ecuador. **Orcid ID:** <https://orcid.org/0000-0002-4899-6076>

Gerardo Medina Ramirez: Biólogo. PhD en Ciencias Biomédicas. Profesor e investigador de la Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Regional Autónoma de los Andes. Ambato. CP-100105. Ecuador. **Orcid ID:** <https://orcid.org/0000-0002-4782-792>