



Antimicrobial resistance in strains *Pseudomonas aeruginosa* isolated from thermal waters at Chimborazo, Ecuador

Title in Spanish: Resistencia antimicrobiana en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de aguas termales de la provincia del Chimborazo, Ecuador

Félix Andueza^{1, 2, 3}, Ana Albuja², Paola Arguelles², Sandra Escobar², Carlos Espinoza², Judith Araque³, Gerardo Medina^{2, 3}

¹Prometeo Senescyt, Ecuador. ²Escuela de Bioquímica y Farmacia. ESPOCH. Ecuador. ³Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela

ABSTRACT: Human intervention in the hot springs has brought its microbiological and chemical contamination. The indiscriminate use of antimicrobials, have resulted in the contamination of various aquatic environments with these substances and bacteria. The objectives were to meet antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from hot springs in the region of Chimborazo, Ecuador. 12 samples of thermal water baths from Chimborazo Province were analyzed. Samples consisted of a volume of 0.5 liters of water. *Pseudomonas aeruginosa* isolation was performed by the membrane filtration technique using cellulose acetate filter 0.45 µm pore, a sample volume of 100 ml and Cetrimide agar. The isolates were identified following schemes MacFadden (2004) and Barrow and Feltham (1993), supplemented with biochemical tests of API (bioMérieux) galleries. The profile of antibiotic resistance was determined by the method of dissemination of Kirby and Bauer (1966) and the results were interpreted according to the CLSI (2014). 15 strains of *Pseudomonas aeruginosa* were identified. All strains were resistant to ampicillin and ampicillin - Sulbactam antibiotics and five were multidrug resistant to six antibiotics (Ampicillin, ampicillin-Sulbactam, amikacin, ceftazidime, cefepime and ciprofloxacin). The results show us the need for studies of resistoma ecosystems hot springs, to determine the presence of resistance genes in indigenous bacteria.

RESUMEN: La intervención humana en los manantiales de aguas termales ha traído su contaminación microbiológica y química. El uso indiscriminado de los antimicrobianos, han desembocado en la contaminación de diversos ambientes acuáticos con estas sustancias y con bacterias resistentes a las mismas. En este sentido el objetivo del presente trabajo fue conocer la resistencia antimicrobiana en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de aguas termales de la región del Chimborazo, Ecuador. Se analizaron 12 muestras de agua termal procedentes de baños de la Provincia del Chimborazo. Las muestras consistieron de un volumen de 0,5 litro de agua de cada manantial. El aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa* se realizó por la técnica de filtración en membrana, utilizando filtros de acetato de celulosa de 0,45 µm de poro, un volumen de muestra de 100 ml y el agar Cetrimida. Las cepas aisladas se identificaron siguiendo los esquemas de MacFadden (2004) y Barrow y Feltham (1993), complementados con las pruebas bioquímicas de las galerías API (bioMérieux). El perfil de resistencia a los antibióticos se determinó por el método de difusión de Kirby y Bauer (1966) interpretándose según el CLSI (2014). Se identificaron 15 cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. Todas las cepas fueron resistentes a los antibióticos Ampicilina y Ampicilina-Sulbactam, y cinco fueron multiresistentes a seis antibióticos (Ampicilina, Ampicilina-Sulbactam, Amikacina, Cefazidime, Cefepime y Ciprofloxacina). Los resultados nos señalan la necesidad de realizar estudios del resistoma de los ecosistemas de las aguas termales, para determinar la presencia de genes de resistencias en las bacterias autóctonas.

*Corresponding Author: felixandueza@hotmail.com

Received: February 22, 2015 Accepted: July 3, 2015

An Real Acad Farm Vol. 81, Nº 2 (2015), pp. 158-163

Language of Manuscript: Spanish

1. INTRODUCCIÓN

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.

Estudios realizados por investigadores a nivel mundial han determinado que las aguas termales no son estériles. En ellas se pueden distinguir dos grupos de bacterias con diferentes orígenes y propiedades. Un grupo puede entrar al agua como contaminante ocasional, procedente del aire,

tierra, resto de plantas y desperdicios humanos. Generalmente representa una población transitoria y no puede crecer en un sustrato con niveles de nutrientes extremadamente bajos, como lo es el agua mineral, por lo que mueren rápidamente. El otro grupo bacteriano corresponde a la llamada microbiota autóctona, consistente de bacterias mesófilas, oligocarbofilicas, tales como miembros de los géneros *Achromobacter*, *Flavobacterium* y *Pseudomonas* (1, 2, 3).

Varias de las especies bacterianas pertenecientes a los principales géneros encontrados en las aguas termales, han sido catalogadas como bacterias patógenas oportunistas, destacando entre ellas los miembros de los géneros *Aeromonas*, *Brevundimonas*, *Burkholderia*, *Chryseomonas*, *Comamonas* y *Pseudomonas* (4, 5, 6).

El género *Pseudomonas* está constituido por bacterias de forma bacilar Gram negativas, pertenecientes a la familia *Pseudomonadaceae*. Se aíslan de suelos, agua, plantas y animales. La epidemiología de *Pseudomonas* refleja su predilección por un medio ambiente húmedo. Dentro de este género destaca la especie *Pseudomonas aeruginosa*, uno de los patógenos oportunistas más importantes implicado en las infecciones nosocomiales en todo el mundo. Es una bacteria ubicua que es capaz de sobrevivir bajo muchas condiciones, y en muchos hospitales puede crear nuevos nichos para su desarrollo. Varios de los sitios, ambientes y objetos implicados en las infecciones nosocomiales por *Pseudomonas aeruginosa* con frecuencia son equipos médicos, aguas envasadas, productos contaminados como gotas para los ojos, soluciones desinfectantes y jabones, así como los propios trabajadores de la salud, otros pacientes contaminados, y algunas veces el paciente en sí mismo (7).

Las infecciones en humanos por *Pseudomonas aeruginosa* se asocian también con reservorios relacionados con el agua fuera de los hospitales (piscinas, bañeras, soluciones para lentes de contacto, entre otras). El número de potenciales factores de virulencia que produce el microorganismo, y el amplio espectro de enfermedades que causa, sugiere que la patogenia de las infecciones por *Pseudomonas aeruginosa* es multifactorial. Deben asumirse múltiples mecanismos patogénicos en enfermedades tan diversas como las septicemias en pacientes neutropénicos, infecciones pulmonares crónicas, en pacientes con fibrosis quística, endocarditis en adictos a la heroína, dermatitis en personas que usan baños calientes y otitis externa en diabéticos ancianos. A pesar de que esta bacteria fue descubierta hace más de un siglo, continúa siendo tema de estudio y análisis, por la importancia clínica, por su prevalencia en infecciones nosocomiales y por la múltiple resistencia a los antibióticos (8).

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 (9, 10, 11, 12).

Se ha señalado el aislamiento de muestras clínicas de cepas de *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 (13).

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 (14).

Tomando en consideración lo antes señalado, se planteó el presente trabajo de investigación cuyo objetivo principal fue determinar la resistencia a los antibióticos en bacterias de la especie *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de agua termal procedentes de la Provincia del Chimborazo, Ecuador.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales

2.1.1. Muestras

Se analizaron un total de 12 muestras de agua termal provenientes de los sitios de emergencia del agua, como de las piscinas utilizadas por los bañistas, de cada uno de los baños termales conocidos como Guayllabamba y los Elenes, ubicados en la Provincia del Chimborazo, Ecuador. De cada baño se tomaron 2 muestras de cada sitio de muestreo por un periodo de 3 semanas. Las muestras consistieron en 500 ml de agua, recolectadas en recipientes estériles. Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su procesamiento en el laboratorio, lo cual se realizó dentro de las 24 horas luego de su recolección.

2.1. Métodos

2.2.1. Recuento de cepas bacterianas de *Pseudomonas aeruginosa* presentes en muestras de agua mineral termal

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 colocaran sobre la superficie del Agar Cetrimida y se incubaron a 37° C durante 24 horas (15, 16).

Finalizado el tiempo de incubación se cuantifico el número de colonias de *Pseudomonas* crecidas, expresándose el resultado como medias aritméticas de las unidades formadoras de colonias de *Pseudomonas* por mililitro (ufc/ml).

Posteriormente, cada colonia se aisló y purificó en Agar Soja Trypticase para su posterior identificación.

2.2.2. Identificaciones taxonómicas de las colonias de *Pseudomonas* aisladas

Las colonias aisladas y purificadas del género *Pseudomonas* se identificaron por medio de las características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas, de acuerdo a los esquemas de identificación bacteriana señalados por MacFadden (2004), (17). Las pruebas bioquímicas y fisiológicas aplicadas se realizaron según lo

indicado por Barrow y Feltham (1993), (18) y complementadas con las pruebas bioquímicas contenidas en las galerías de identificación bacteriana API 20 NE (bioMeriaux).

Las cepas bacterianas aisladas se clasificaron siguiendo los criterios taxonómicos del Manual de Bergey (19) y la nomenclatura del Comité Internacional de Sistemática Bacteriana (ICSB) y publicadas en el International Journal of Systematic Bacteriology.

2.2.3. Determinación del perfil de susceptibilidad a los antibióticos de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas

Se utilizó el método de difusión en agar de acuerdo a la técnica Kirby y Bauer, (20). Se tomaron 200 µl de una suspensión de bacterias equivalente al McFarland 0,5 y se mezclaron con 100 ml de agar antibiótico. Se depositaron 25 ml en cuatro placas de Petri estériles y una vez solidificado se colocaron sobre su superficie discos de ceftazidime (CF, 30µg), ampicilina (AMP, 10µg), ampicilina-Sulbactam (AMP-S, 10 µg), amikacina (AMI, 15µg), cefepime (CE, 30µg), vancomicina (VAN, 30 µg) y ciprofloxacina (CIP, 5µg). La selección de antibióticos se realizó de acuerdo a lo recomendado por el CLSI (21) y en base a la disponibilidad de las casas comerciales

Se incubaron durante 48 horas a 37°C. Una vez finalizada la incubación se llevó a cabo la lectura e interpretación de los resultados. Se utilizó como cepas de control, cepas de referencia de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. La prueba se interpretó de acuerdo a las recomendaciones del CLSI (21).

3. RESULTADOS

Se estudiaron las aguas termales de los baños Guayllabamba y los Elenes, ubicados en la Provincia del Chimborazo, Ecuador. Las aguas de estos manantiales se caracterizan por presentar una temperatura promedio en sus puntos de emergencia de 40° C y una temperatura promedio ambiental de 12°C. Desde el punto de vista de su composición química, serían aguas clasificadas como sulfatadas magnésicas (22).

De las 12 muestras de agua termal examinada, tanto de los sitios de emergencia como de las piscinas, se logró detectar la presencia de colonias de la especie *Pseudomonas aeruginosa* con un contaje promedio de 4 UFC/100 ml en los puntos de emergencia del agua, y de 7 UFC/100 ml en las piscinas.

De las muestras donde se detectó el crecimiento de colonias bacterianas, se aislaron e identificaron 20 cepas pertenecientes al género *Pseudomonas*, de las cuales 15 resultaron pertenecer a la especie *Pseudomonas aeruginosa* y 5 a otras especies de *Pseudomonas*, tales como *Pseudomonas putida* (1 cepa) y *Pseudomonas stutzeri* (4 cepas).

De las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* identificadas, 6 se aislaron de los puntos de emergencia y 9 de las piscinas.

Todas las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas e identificadas resultaron sensibles a la vancomicina y resistentes a los antibióticos Ampicilina y Ampicilina-Sulbactam, y 5 cepas, que corresponde al 33,33 % del total aisladas, fueron multiresistentes a seis antibióticos diferentes: Ampicilina, Ampicilina-Sulbactam, Amikacina, Ceftazidime, Cefepime y Ciprofloxacina (Tabla 1).

Tabla 1. Perfil de resistencia a diversos antibióticos de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas en muestras de aguas termales pertenecientes a la Provincia del Chimborazo, Ecuador.

Cepa <i>P. aeruginosa</i>	CF (30µg)	AMP (10µg)	AMP-S (10 µg)	VAN (30 µg)	AMI (15µg)	CE (30µg)	CIP (5µg)
1 PE	S	R	R	S	S	S	S
2 PE	S	R	R	S	S	S	S
3 PE	R	R	R	S	R	R	R
4 PE	S	R	R	S	S	S	S
5 PE	S	R	R	S	S	S	S
6 PE	S	R	R	S	S	S	S
7 PIS	R	R	R	S	R	R	R
8 PIS	S	R	R	S	S	S	S
9 PIS	R	R	R	S	R	R	R
10 PIS	R	R	R	S	R	R	R
11 PIS	S	R	R	S	S	S	S
12 PIS	S	R	R	S	S	S	S
13 PIS	S	R	R	S	S	S	S
14 PIS	S	R	R	S	S	S	S
15 PIS	R	R	R	S	R	R	R
Referencia	S	R	R	S	S	S	S

Nota: CF= ceftazidime; AMP= ampicilina; AMP-S= ampicilina-Sulbactam; VAN= vancomicina; AMI= amikacina; CE= cefepime; CIP= ciprofloxacina R= resistente; S= sensible; PE= Punto de Emergencia del agua; PIS= Piscina

4. DISCUSIÓN

La presencia de cepas de la especie *Pseudomonas aeruginosa* en las aguas minerales naturales, como lo son las aguas termales, es un fenómeno muy común en este tipo de ecosistema acuático, donde esta especie bacteriana, gracias a su amplia capacidad metabólica puede sobrevivir y desarrollarse, así como cumplir diversas funciones dentro de estos sistemas acuáticos, tales como moduladores de los ciclos de los principales elementos químicos, formación de biofilms y depurador de la contaminación química y biológica (3, 7, 23, 24).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, respecto a la presencia de *Pseudomonas aeruginosa*, son similares a los señalados por otros investigadores para el agua de manantiales termales de diferentes partes del mundo (25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32).

Rosenberg y Hernández-Duquino (1989), señalan la experiencia de un laboratorio en Alemania en donde en un período de 3 años (1985-1988) lograron aislar *Pseudomonas aeruginosa* en un 10 % de las muestras estudiadas (33). De igual forma Richards y col. (1992), reportan el aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa* en un 4 % de las muestras de agua mineral examinadas en un estudio llevado a cabo en Inglaterra (34).

La presencia de *Pseudomonas aeruginosa* en el agua termal, puede reflejar una contaminación muy importante en las mismas. La explicación del hecho pudiera estar en una contaminación de la fuente o manantial de agua mineral, falta de protección adecuada del acuífero que surge del agua, la presencia de biofilms en las paredes o piedras donde sale el agua, aguas de escorrentía o debido a la descarga de desechos de origen animal o humano en los manantiales termales (23, 24, 25).

Por otra parte, la presencia de bacterias oportunistas como *Pseudomonas aeruginosa* en las aguas termales, trae consigo el problema de que se debe considerar la resistencia a los antimicrobianos, ya que esta es una de las bacterias que en las últimas décadas ha demostrado una gran capacidad para transmitir y dispersar muchos de los genes responsables de estas características (35).

Diversos autores han demostrado la presencia de cepas bacterianas resistentes y multiresistentes a los antibióticos en las aguas minerales, destacando entre ellas los miembros del género *Pseudomonas* (36, 37, 38) lo que es de gran interés desde el punto de vista de la epidemiología, y sobre todo de la salud pública, dado a que las aguas minerales son utilizadas en su mayoría por personas enfermas o con su sistema inmunológico comprometidos.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, en relación a la presencia de resistencia y multiresistencia a los antibióticos de uso para combatir las infecciones producidas por esta especie bacteriana, son similares a los resultados que han obtenido otros autores en aguas minerales en diferentes partes del mundo (13, 33, 36, 37, 39, 40).

El rápido incremento de la resistencia a los antibióticos en las comunidades bacterianas es un fenómeno ecológico,

pero también es un fenómeno biológico, genético, epidemiológico y social (38).

Se ha postulado que la resistencia bacteriana a los antimicrobianos es el resultado del uso indiscriminado de estas sustancias, que ejercen presión selectiva, promoviendo la supervivencia de bacterias mejor dotadas para evitar su efecto letal (41).

En un trabajo realizado en Italia por Messi y col., en el año 2005, sobre la presencia de bacterias resistentes a los antibióticos en aguas minerales, se señala que el 55 % de las cepas multiresistentes aisladas correspondían a cepas del género *Pseudomonas* (36). Resultados parecidos a los obtenidos en el presente trabajo y que reflejan el papel que juega el género *Pseudomonas* en la dispersión y diseminación de los factores genéticos responsables de la resistencia a diversos antibióticos.

Ullah y col., en el año 2012, en una investigación realizada en Pakistán, donde se estudió la presencia de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y sus perfiles de resistencia antimicrobiana en aguas minerales, señala la presencia de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a una gran diversidad de antibióticos con una alta prevalencia de cepas multiresistentes (42), muy similar a los resultados obtenidos en el presente estudio donde casi la mitad de las cepas obtenidas presentan multiresistencia a 6 antibióticos de los mismo grupos químicos analizados en ambos trabajos.

Los análisis de secuencias de los genes de resistencia de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* de origen clínico, han revelado una estrecha relación con las especies de *Pseudomonas* de origen ambiental, lo que lleva a pensar en el importante papel del medio ambiente en la diseminación de los genes responsables de estas características (42, 43).

Estudios realizados en los últimos años evidencian que en casi todos los ecosistemas, incluidos los de los medios acuáticos, existe un reservorio de genes de resistencia en la población de microorganismos autóctonos, que se ha denominado resistoma de antibióticos que es capaz de comunicarse y diseminar estos genes entre las bacterias de distintos tipos de ecosistema incluido el humano (14).

Los resultados obtenidos en relación a los perfiles de resistencia antimicrobiana de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* presentes en el agua termal, muestran que este tipo de agua puede ser un reservorio importante de los genes de resistencia a diversos antibióticos y que se deben aplicar medidas de vigilancia epidemiológicas tanto en los manantiales fuentes de esta agua, como en las piscinas empleadas en cada baño.

5. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la importancia de los ecosistemas acuáticos como resistoma de antibióticos y un medio intermediario en la diseminación y dispersión de genes de resistencias antimicrobiana y de bacterias patógenas resistentes y multiresistentes a diversos antibióticos, mostrando la necesidad de realizar estudio microbiológicos y epidemiológicos permanentes sobre las aguas minerales

termales, para evitar la posibilidad de brotes epidémicos, tanto en grupos poblacionales con mayor sensibilidad a las infecciones como lo son niños, ancianos, pacientes inmunosuprimidos o en estado de convalecencia, como en la población en general, así como la dispersión de cepas multiresistentes dentro de la población que utiliza los balnearios de aguas termales para mejorar su salud.

6. AGRADECIMIENTO

Nuestro agradecimiento al Senescyt, Ecuador por la beca otorgada para realizar esta investigación, y a la Escuela Superior Politécnica del Chimborazo Ecuador (ESPOCH) a través de la Escuela de Bioquímica y Farmacia de la Facultad de Ciencias, así como a la Universidad de los Andes Venezuela (ULA), a través del Laboratorio de Microbiología del agua de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis y el CDCHTA (Proyecto FA-432-A. Año 2009) por la ayuda aportada en insumos y recursos humanos para poder llevar a buen término la investigación planteada.

7. REFERENCIAS

- Schmidt-Lorenz W. Microbiological characteristics of natural mineral waters. *Ann Ist Super Sanita*. 1976; 12: 93-112.
- Quevedo-Sarmiento J, Ramos-Cormenzana A, González-López J. Isolation and characterization of aerobic heterotrophic bacteria from natural spring waters in the Lanjarón (Spain). *J Appl Bacteriol*. 1986; 61: 365-372.
- De la Rosa MC, Mosso MA. *Diversidad microbiana de las aguas minerales termales*. En: Panorama actual de las aguas minerales y minero-medicinales de España, Ed. A. López y J.L. Pínuaga. Instituto Tecnológico Geominero de España. Madrid. España. 2000; pp. 153-158
- Leoni E, Zanetti F, Cristino S, Legnani P. Monitoring and control of opportunistic bacteria in spa water used for aerosol hydrotherapy. *Ann Ig*. 2005; 17: 377-384.
- Rosas I. *Microbiología ambiental*. Instituto Nacional de Ecología. Mexico D.F. Mexico. 2004.
- Kayser F, Bienz K, Eckert J. *Medical microbiology*. Edit. Thieme. USA. 2011. pp. 1-356
- Ramos J, Filloux A. *Pseudomonas*. Vol.6. Edit. Springer. London UK. 2010; pp. 1-687
- Hauser A, Rello J. *Severe infections caused by Pseudomonas aeruginosa*. Springer-Verlag GMBH. Berlin, Alemania. 2003; pp. 1-263
- Arias C, Murray B. Antibiotic-resistant bugs in the 21st century-A clinical super challenge. *N Engl J Med*. 2009; 360 (5): 439-443.
- Al-Ghazzi M, Jazrawi S, Al-Doori. Antibiotics resistance among pollution indicator bacteria isolated from Al-Khair River, Baghdad. *Wat Res*. 1988; 2: 641-4.
- Andersen J, Sandaa R. Distribution of tetracycline resistance determinants among Gram negative bacteria isolated from polluted and unpolluted marine sediments. *Appl Environ Microbiol*. 1994; 60: 908-12.
- Andersson D, Levin B. The biological cost of antibiotic resistance. *Curr Op Microbiol*. 1999; 2: 489-93.
- Tirodimos I, Arvanitidou M, Dardavessis L, Bisiklis A, Alexiov-Daniil S. Prevalence and antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolate from swimming pools in northern Greece *East Mediterr Health J*. 2010; 16: 783-787.
- Dante G, Sommer M. Genética de la resistencia microbiana. *Investigación y Ciencias*. 2014; Agosto: 28-34.
- American Public Health Association (APHA). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. APHA. Edition 21. Washington. USA. 2005
- International Organization for Standardization (ISO). *Water quality. Detection and enumeration of Pseudomonas aeruginosa. Membrane filtration method*. 16266:2006, International. Geneva. 2006.
- MacFaddin J. *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. Tercera edición. Editorial médica Panamericana. Buenos Aires. Argentina. 2004; pp. 1-850
- Barrow G, Feltham RKA. *Cowan and Steel's. Manual for the identification of medical bacteria*. Ed. Cambridge University Press. Cambridge. UK. 1993
- Garrity G, Brenner D, Krieg N, Staley J. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Second Ed. Vol. II. Springer. New York. USA. 2005
- Bauer A, Kirby W, Sherry J, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol*. 1966; 45:493-496
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; M100-S24*. Twenty fourth informational supplement. 2014.
- Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología (INAMHI). *Aguas termo minerales del Ecuador*. INAMHI. Quito. Ecuador. 2013, pp
- Freya E. *Cooperative behavior in Pseudomonas aeruginosa: Ecology, evolution and pathology*. University of Oxford. Uk. 207; pp. 1-223
- Botzenhart K, Doring G. *Ecology and epidemiology of Pseudomonas aeruginosa*. In *Pseudomonas aeruginosa as an opportunistic pathogen*. Springer. USA. 1993; pp. 1-18
- Andueza F. *Diversidad microbiana de las aguas mineromedicinales de los baños de Jaraba. Tesis de doctorado. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. España*. 2007
- Pereira S. *Pseudomonas aeruginosa em ambiente termal: prevalencia e determinantes de patogenicidade. Tesis de Doutoramento. Faculdade de farmacia, Universidad de Coimbra. Portugal*. 2014.

27. Legnani P, Leoni E, Rapuano S, Turin D, Valenti C. Survival and growth of *Pseudomonas aeruginosa* in mineral natural water: a 5 year study. *Int J Food Microbiol.* 1999; 32: 153-15
28. Mosso MA, Sánchez M, de la Rosa, MC. Microbiología del agua mineromedicinal de los balnearios de Alhama de Granada. *An R Acad Nac Farm.* 2002; 68: 381-405.
29. Moore J, Heaney N, Millar B, Crowe M, Elborn J. Incidence of *Pseudomonas aeruginosa* in recreational and hydrotherapy pools. *Commun Dis Public Health.* 2002; 5: 23-26.
30. Tiago I, Chung AP, Veríssimo A. Bacterial diversity in a non-saline alkaline environment: heterotrophic aerobic populations. *Appl Environ Microbiol.* 2004 ; 70: 7378-7387.
31. De la Rosa MC, Andueza F, Sanchez MC, Rodriguez MC, Mosso MA. Microbiología de las aguas mineromedicinales de los Balnearios de Jaraba. *An R Acad Nac Farm.* 2004; 70: 521-542.
32. De la Rosa MC, Sanchez MC, Rodriguez MC, Mosso MA. Microbiología del manantial mineromedicinal del Balneario. Puente Viesgo. *An R Acad Nac Farm.* 2007; 73: 251-265.
33. Rosenberg F, Hernandez-Duquino H. Antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* from German mineral waters. *Tox Ass* 1989; 4: 281-294.
34. Richards J, Stokely D, Hipgrave P. Quality of drinking water. *BMJ.* 1992; 304: 571
35. Strateva T, Yordanov D. *Pseudomonas aeruginosa* – a phenomenon of bacterial resistance. *Journal of medical microbiology.* 2009; 58: 1133-1148
36. Messi P, Guerrieri E, Bondi M. Antibiotic resistance and antibacterial activity in heterotrophic bacteria of mineral water origin. *Sci Total Environ.* 2005; 346: 213-219.
37. Falcone-Dias MF, Vaz-Moreira I, Manaia CM. (2012). Bottled mineral water as a potential source of antibiotic resistant bacteria. *Water Res.* 2012; 46(11):3612-3622
38. Baquero F, Martinez J, Canton R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current Opinion in Biotechnology.* 2008; 19 (3): 260-265.
39. Hernandez-Duquino, Rosenberg F. Antibiotic resistant *Pseudomonas* in mineral water. *Canadian Journal of Microbiology.* 1987; 33: 286-289.
40. Macerata U, Levre E, Armani G, Agostini G., Molinari G., Caroli G. Bacterial species detected in some bottled mineral waters sold in Italy. *Int J Clin Pharmacol Res.* 1988; 8: 31-37.
41. Alonso A, Sanchez P, Martinez J. Environmental selection of antibiotic resistance genes, *Environ Microbiol.* 2001; 3: 1-9.
42. Ullah A, Durrani R, Ali G, Ahmed S. Prevalence of antimicrobial resistant *Pseudomonas aeruginosa* in fresh water spring contaminated with domestic sewage. *Journal of Biological and Food Science Research.* 2012; 1 (2): 19-22
43. Eckmanns T, Oppert M, Martin M, Amorosa R, Zuschneid I, Frei U, Rüden H, Weist K. (2008). An outbreak of hospital-acquired *Pseudomonas aeruginosa* infection caused by contaminated bottled water in intensive care units. *Clinical Microbiology and Infection.* 2008; 14 (5): 454-458.