

Microbiota extremofila y resistomas ambientales de la fuente termal “termas La Merced” Quito-Ecuador

Microbiota extremofila and environmental resistomas of the thermal spring “thermal Baths La Merced” Quito-Ecuador



***Medina-Ramírez Gerardo. PhD.** Escuela Superior Politécnica del Chimborazo (ESPOCH). Riobamba-Ecuador/medinag47@gmail.com /

Naranjo Carina. BQF. Escuela Superior Politécnica del Chimborazo (ESPOCH). Riobamba-Ecuador / baby_gatita_cn@hotmail.com /

Escobar Sandra. MSc. Escuela Superior Politécnica del Chimborazo (ESPOCH). Riobamba-Ecuador / kasandraea@gmail.com /

Araque Judith. MSc. Universidad de los Andes (ULA) Mérida-Venezuela/ juditharaque@ula.ve

****Djabayan Pablo. PhD.** Universidad Nacional del Chimborazo (UNACH). Riobamba-Ecuador / pdjabayan@gmail.com

*****Andueza Félix. PhD.** Universidad Central del Ecuador (UCE). Quito-Ecuador / fdandueza@uce.edu.ec

Resumen

Las aguas termales no son estériles, poseen una microbiota reflejo de sus características fisicoquímicas extremas. Existen evidencias que esta microbiota puede ser el reservorio de genes de resistencia a los antibióticos, denominados resistomas ambientales. Por ello, el objetivo del presente trabajo fue estudiar la microbiota bacteriana del agua del Balneario Termas la Merced, ubicado cerca de la Ciudad de Quito, Ecuador, con el fin de aislar e identificar las bacterias presentes y determinar sus patrones de resistencia a los antibióticos. Se recolectaron muestras de agua termal, tanto de la zona de emergencia, como de las piscinas utilizadas por los bañistas durante los meses de julio a diciembre del 2015. Se realizó el aislamiento bacteriano, utilizando las placas de Petrifilm™, para bacterias aerobias mesófilas. La identificación de las colonias bacterianas se realizó de acuerdo a las pruebas sugeridas por MacFaddin (2003) y Barrow y Feltham (1993), suplementadas con las pruebas de identificación bacteriano Microgen™.

Los perfiles de susceptibilidad a antibióticos se realizaron utilizando el método de Kirby Bauer. Se 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. El mayor número de resistencias (4 antibióticos) lo exhibieron cepas de la especie *Brevundimonas diminuta*. Todos los aislados mostraron resistencia a la Cefalotina. Se demuestra que estas aguas poseen una microbiota bacteriana característica y la presencia de resistomas ambientales.

Palabras clave: aguas termales; microbiota; resistomas

Abstract

*The thermal waters are not sterile they possess a microbiota reflecting their physicochemical extreme characteristics. There is evidence that this microbiota may be the reservoir of antibiotic resistance genes, termed environmental resistomas. Therefore, the objective of the present work was to study the water bacterial microbiota of the Termas la Merced Spa, located near the City of Quito, Ecuador, to isolate the bacteria and determine the resistance patterns to antibiotics. Thermal water samples were collected from both the emergency area and the swimming pools used by bathers for a period of 6 months between July and December 2015. The isolate of the mesophilic aerobic bacteria using the Petrifilm™ plates. Identification of bacterial colonies was performed according to the tests suggested by MacFaddin (2003) and Barrow and Feltham (1993), supplemented with Microgen™ bacterial identification tests. Antibiotic susceptibility profiles were performed using the Kirby Bauer method. A total of 13 bacterial clones corresponding to *Brevundimonas diminuta*, *Aeromonas schubertii*, *Budvicia aquatica*, *Acinetobacter haemolyticus*, *Bacillus* spp, *Citrobacter amalonaticus*, *Pseudomonas stutzeri* and *Xenorhabdus beddingii* were identified. All isolates showed resistance to at least one antibiotic.*

*The highest number of resistance (4 antibiotics) was exhibited by *Brevundimonas diminuta* strains. All isolates showed resistance to Cephalothin. It is demonstrated that these waters possess a characteristic microbiota and the presence of environmental resistomas.*

Keywords: hot springs; microbiota; resistomas

1. Introducción

La microbiota extremofila conforma una población de microorganismos muy diversos, cuya característica más importante es la de poseer condiciones óptimas para su desarrollo muy diferentes a las que poseen los microorganismos considerados como normales, por ejemplo, crecer a valores altos o bajos de temperatura y pH, crecimiento en aguas con alta salinidad y presión osmótica, presencia en ambientes con alta presión y radiación, entre otros. Muchos de estos organismos se encuentran dentro de los dominios Archaea y Bacteria, donde se incluyen una gran variedad de microorganismos capaces de vivir en condiciones ambientales extremas [1].

En los últimos años el interés por los microorganismos extremófilos se ha incrementado debido a que, como parte del acervo genético y metabólico, se han descrito un gran número de moléculas con actividades muy diversas (metabolitos secundarios, antibióticos, enzimas, etc.) capaces de realizar sus funciones en condiciones extremas, las cuales en muchos casos son comparables a las que ocurren en los procesos industriales y ambientales, haciendo que estas moléculas y/o los microorganismos que las poseen puedan ser utilizados como herramientas de aplicación industrial y ambiental [2,3].

No obstante también ha despertado interés desde el punto de vista sanitario, la posibilidad de que estos microorganismos puedan constituir un reservorio natural de genes de resistencia a antibióticos (Resistomas), los cuales pueden ser trasladados por procesos como la conjugación a los microorganismos patógenos que pudieran llegar de manera circunstancial a las fuentes termales, transformándose entonces en un problema de salud debido a que podrían generar el surgimiento de resistencia a antibióticos, en microorganismos de importancia sanitaria presente en estos ambientes [4].

Este hecho es muy importante, debido a que estos lugares son muy frecuentados por personas con problemas de salud, quienes asisten a estos lugares en busca de alivio a sus dolencias, sin embargo lejos de obtener su objetivo pueden ser infectados por microorganismos patógenos transmitidos por otras personas, los cuales al interactuar con la microbiota residente que posee genes de resistencia de manera natural, pudieran incrementar o modificar su estructura genética adquiriendo nuevos genes, lo que podría complicar los tratamientos.

En atención a lo mencionado, y al hecho de que a pesar que Ecuador posee una gran cantidad y variedad de fuentes termales, que son utilizadas con fines terapéuticos

y recreacionales por una gran cantidad de personas, existen muy pocos estudios microbiológicos y de presencia de resistomas ambientales en este tipo de agua. Por ello, se planteó el presente trabajo de investigación, que constituye el primer trabajo microbiológico realizados para estos manantiales, cuyo objetivo fue realizar un estudio de la microbiota presente en las fuentes termales del Balneario Termas la Merced, ubicado en las cercanías de la Ciudad de Quito, Ecuador, con el fin de aislar e identificar las bacterias autóctonas de estas aguas, y posteriormente determinar los patrones de resistencia a antibióticos de las mismas, de igual manera conocer la diversidad de la microbiota bacteriana extremofila y si estos ecosistemas actúan como resistomas ambientales.

2. Material y métodos

En el presente trabajo se utilizó el diseño de estudios descriptivos observacionales no experimentales para investigaciones en el área de la Microbiología,

2.1. Toma de las muestras

Se analizaron un total de 10 muestras de agua termal procedentes del Balneario Termas la Merced, ubicado en las cercanías de la Ciudad de Quito, Ecuador, tanto de la zona de emergencia del manantial termales (5 muestras), como en las piscinas utilizadas por los bañistas (5 muestras). Las muestras de agua fueron recolectadas de manera aséptica durante los meses de julio a diciembre del año 2015, utilizando recipientes de plástico estériles de 150 ml. Las mismas fueron trasladadas en contenedores de anime para mantener la temperatura de la fuente durante el transporte a los laboratorios de microbiología de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH donde se realizaron los análisis microbiológicos, en un periodo no mayor de 24 horas luego de su recolección [4, 5, 6].

2.3. Análisis microbiológico

Se realizó la siembra y aislamiento bacteriano utilizando las placas de cultivo Petrifilm™, según el protocolo sugerido por el fabricante, incubando las placas de Petrifilm a una temperatura de 35° C, durante un periodo de 48 a 72 horas [5].

Selección y purificación de las colonias bacterianas aisladas

De las bacterias crecidas en las placas Petrifilm, se seleccionaron al menos un representante de cada uno de los tipos de colonias obtenidas, de acuerdo a las



características macroscópicas exhibidas, y se inocularon en cajas Petri con agar Mueller Hinton, incubando durante 24 horas a 35 °C. El proceso de repique se repitió al menos tres veces para obtener un aislado bacteriano estable, posteriormente estos aislados fueron sometidos a un re-aislamiento para obtener clones puros, aplicando la técnica de siembra por agotamiento [6].

Identificación de los aislados bacterianos

Sobre las colonias bacterianas aisladas y purificadas, se procedió a realizar la tinción de Gram, la prueba de la oxidasa, catalasa, así como una serie de pruebas fisiológicas y bioquímicas para cada tipo de bacterias aisladas [7,8] para identificarlas, de ser posible, hasta el nivel de especie y en los casos en que fue necesario se realizó su identificación utilizando el sistema de identificación bacteriano Microgen™ GN-ID [6,7,8]

Determinación del perfil de susceptibilidad a diversos antibióticos

Sobre cada una de los clones bacterianos identificados, se determinaron los perfiles de susceptibilidad a diversos antibióticos utilizando el método de Kirby Bauer de difusión en Agar Mueller Hinton [9] con la ayuda de discos de diversos tipos de antibióticos: Ampicilina (AM) 10µg; Amoxicilina/ácido clavulánico (AMC) 20/10µg; Cefalotina (KF) 30µg; Ceftriaxona (CRO) 30µg; Oxacilina (OX) 1µg; Ciprofloxacina (CIP) 5µg; Eritromicina (E) 15µg; Gentamicina (CN) 10µg; Imipenem (IPM) 10µg; Meropenem (MEN) 10µg; Penicilina (P) 10U; Trimetoprim/sulfametoxazol (STX) 1.25/23.75 µg.

La metodología que se aplicó fue la indicada por Flores y colaboradores (2010), en donde se utilizaron placas de Agar Mueller Hinton, las cuales fueron inoculadas con suspensiones de cada una de los aislados bacterianos ajustando la turbidez a 0,5 Macfarlán (1.5×10^8 UFC/m), para lo cual se utilizó un hisopo estéril. Se dejó secar el inóculo por 5 minutos y se colocaron los discos de antibióticos sobre el agar utilizando pinzas estériles. Posteriormente, las placas se incubaron a 35°C durante 48 horas, al cabo de las cuales se procedió a determinar la presencia o ausencia de halos de inhibición [10].

3. Resultados

Bajo las condiciones de muestreo utilizadas en el presente estudio, las muestras de agua del balneario Termas la Merced, tomadas en la zona de emergencia del manantial, no mostraron ningún crecimiento bacteriano.

Por el contrario, a partir de las muestras de agua tomada de las piscinas utilizadas por los bañistas, se

pudo aislar e identificar un total de 13 clones bacterianos (Tabla 1) de los cuales el mayor número correspondió a la especie bacteriana *Brevundimonas diminuta* con cuatro aislados identificados, seguida por las especies *Aeromonas schubertii* y *Budvicia aquatica*, con dos aislados cada una, seguidas por las especies *Acinetobacter haemolyticus*, *Bacillus* spp, *Citrobacter amalonaticus*, *Pseudomonas stutzeri* y *Xenorhabdus beddingii*, con un aislado.

Tabla 1.

Identificación de los aislados bacterianos

NÚMERO DE CLONES	ESPECIE
4	<i>Brevundimonas diminuta</i>
1	<i>Citrobacter amalonaticus</i>
1	<i>Bacillus</i> spp.
2	<i>Aeromonas schubertii</i>
2	<i>Budvicia aquatica</i>
1	<i>Xenorhabdus beddingii</i>
1	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
1	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>

Los resultados correspondientes a los perfiles de resistencia y susceptibilidad a los antibióticos realizados a las clones bacterianos aislados e identificados se resumen en las tablas 2 y 3.

La evaluación de la resistencia a antibióticos de los aislados bacterianos mostró un comportamiento variado, aunque todos los aislados mostraron resistencia al menos a un antibiótico (Tabla 2 y Tabla 3).

El mayor número de resistencias (4 antibióticos) fue encontrado para los Clones 2 y 12 de *Brevundimonas diminuta* que resultaron resistentes a los antibióticos Amoxicilina/ácido clavulánico, Imipenem, Cefalotina y Ampicilina, así como para la colonia de *Bacillus* spp (Clon 9) que resultó resistente a los antibióticos Cefalotina, Ampicilina, Penicilina y Oxacilina; los aislados *Aeromonas schubertii* (Clon 16) y *Pseudomonas stutzeri* (Clon 31) mostraron resistencia a los antibióticos Amoxicilina/ácido clavulánico, Cefalotina y Ampicilina; *Brevundimonas diminuta* (Clon 6) presentó resistencia a los antibióticos Amoxicilina/ácido clavulánico y Cefalotina; los restantes 7 clones mostraron resistencia solo a Cefalotina.

Todos los aislados fueron sensibles a los antibióticos Trimetoprim/sulfametoxazol, Gentamicina y Ceftriaxona, mientras que ante la Cefalotina todos los aislados bacterianos mostraron resistencia.

Tabla 2

Antibiograma de los aislados bacterianos Gram negativos

Tabla 2. Antibiograma de los aislados bacterianos Gram negativos.

N° Clon	Nombre	ANTIBIÓTICOS							
		AMC	IPM	STX	CN	CRO	KF	AM	CIP
2	<i>Brevundimonas diminuta</i>	R	R	S	S	S	R	R	S
5	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	S	S	S	S	S	R	S	ND
6	<i>Brevundimonas diminuta</i>	R	ND	S	S	S	R	S	S
12	<i>Brevundimonas diminuta</i>	R	R	S	S	S	R	R	S
13	<i>Aeromonas schubertii</i>	S	ND	S	S	S	R	S	S
16	<i>Aeromonas schubertii</i>	R	S	S	S	S	R	R	ND
18	<i>Budvicia aquatica</i>	S	S	S	S	S	R	S	S
22	<i>Xenorhabdus beddingii</i>	S	S	S	S	S	R	S	ND
23	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	S	S	S	S	S	R	S	ND
27	<i>Budvicia aquatica</i>	S	ND	S	S	S	R	S	S
28	<i>Brevundimonas diminuta</i>	S	ND	S	S	S	R	S	S
31	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	R	S	S	S	S	R	R	S

Resistente: R; Sensible: S; No determinado: ND

Tabla 3

Antibiograma del aislado bacteriano Bacillus spp.

Nombre	ANTIBIÓTICOS						
	OX	E	CN	P	KF	AM	CIP
<i>Bacillus spp.</i>	R	S	S	R	R	R	S

Resistente: R; Sensible: S; No determinado: ND

4. Discusión

Las muestras de agua del balneario Termas la Merced, tomadas en la zona de emergencia del manantial, no mostraron ningún crecimiento bacteriano. Este tipo de resultado donde no se observa un crecimiento bacteriano puede ser debido a las extremas condiciones de temperatura y concentración de sales que tienen este tipo de agua y son similares a otros estudios de aguas termales, donde se ha señalado crecimiento bacteriano nulo o escaso crecimiento en algunos manantiales de aguas termales [11, 12, 13].

Diversos autores reportan a los géneros *Aeromonas*,

Brevundimonas y en especial *Pseudomonas*, como microbiota común en estos ambientes acuáticos [13, 14, 15], resultados coincidentes con los resultados obtenidos en el presente trabajo.

La evaluación de la resistencia a antibióticos de los aislados bacterianos mostró un comportamiento variado (Tablas 2 y 3). Todos los aislados mostraron resistencia al menos a un antibiótico y se evidenció la presencia de cepas bacterianas multiresistentes al menos a 2 antibióticos, lo cual constituye un riesgo para la salud de las personas que acuden a estos manantiales por la posibilidad de infectarse con estas cepas.

Resultados similares a los encontrados en el presente trabajo, sobre todo en el caso de las bacterias de los géneros *Aeromonas*, *Brevundimonas* y *Pseudomonas*, han sido reportados por autores en diversos manantiales de aguas termales del mundo [4, 16, 17, 18, 19, 20].

De igual forma, los resultados muestran una gran prevalencia en estas aguas de bacterias multiresistentes a antibióticos de uso cotidiano, tanto en medicina humana, como en la medicina veterinaria. Esto indicaría un uso inadecuado de antibióticos en la zona de estudio o la posibilidad de una transferencia horizontal de genes entre bacterias patógenas que ingresan en estos ecosistemas por medio de las personas enfermas que acuden a ellas para restablecer su salud, y las bacterias autóctonas propias de estas aguas [4].

En los últimos años se ha acuñado el término de Resistomas para designar aquellos ecosistemas donde se ha generado por presión selectiva, un acumulo de genes de resistencia antimicrobiana; no está claro aún si estos Resistomas son el producto de un proceso evolutivo bacteriano, o resultado del uso indiscriminado de los antibióticos por parte de la humanidad, o de ambos procesos [21].

En todo caso, el presente trabajo evidencia la existencia de Resistomas en los manantiales de aguas termales, que debería tenerse en cuenta al momento de indicar estas aguas a pacientes con problemas inmunológicos o en tratamiento con drogas supresoras inmunológicas y que, además, estaría indicando una contaminación moderada de estas aguas. Por otra parte, se encuentra que en estos ecosistemas habita una microbiota bacteriana extremofila escasa, aunque específica, que se ha adaptado a las condiciones fisicoquímicas extremas prevalente en estas aguas [21].

5. Conclusiones

- Se detectó la presencia de una microbiota bacteriana extremofila característica, aunque escasa, lográndose aislar e identificar 13 clones bacterianos. Las especies identificadas fueron: *Brevundimonas diminuta*, *Aeromonas schubertii*, *Budvicia aquatica*, *Acinetobacter haemolyticus*, *Bacillus spp*, *Citrobacter amalonaticus*, *Pseudomonas stutzeri* y *Xenorhabdus beddingii*.



- El fenómeno de multiresistencia se observó en las cepas de *Brevundimonas diminuta* (resistente a 4 antibióticos), *Bacillus* spp (resistencia a 3 antibióticos), *Aeromonas schubertii* (resistencia 3 antibióticos) y *Pseudomonas stutzeri* (resistencia a 3 antibióticos) y *Brevundimonas diminuta* (resistencia a 2 antibióticos). Todos los aislados fueron sensibles a los antibióticos Trimetoprim/sulfametoxazol, Gentamicina y Ceftriaxona.
- Los resultados obtenidos señalan la necesidad de realizar estudios más extensos para determinar a nivel genético, los mecanismos de resistencia presente en las cepas de las especies bacterianas encontradas, así como los mecanismos de transferencia genética involucrados. De igual forma, implementar sistemas de vigilancia epidemiológica y ambiental, a través de la elaboración de mapas de riesgos para disminuir el posible impacto de estos Resistomas en el ambiente y por ende en la salud humana.

6. Bibliografía

- [1]. MANZI, L. MAYZ, J. (2003). Valorando Microorganismos. Rev. Soc. Ven. Microbiol. 23: (1)
- [2]. NIEHAUS, F.; BERTOLDO, C.; KAHLER, M.; ANTRANIKIAN, G. (1999). Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Appl. Microbiol Biotechnol* 51: 711-729.
- [3]. RAMÍREZ, N.; SANDOVAL, A.; SERRANO, J. Las bacterias halófilas y sus aplicaciones biotecnológicas. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* [revista en la Internet]. 2004 Ene [citado 2015 agosto 1]; 24(1-2): 12-23. Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562004000100004&lng=es.
- [4]. ANDUEZA, F.; ALBUJA, A.; ARGUELLO, P.; ESCOBAR, S.; ESPINOZA, C.; ARAQUE, J.; MEDINA, G; (2015). Antimicrobial resistance in strains *Pseudomonas aeruginosa* isolated from thermal waters at Chimborazo, Ecuador. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*. Vol. 81 (2): 158-163
- [5]. 3M. (2009). Petrifilm. Guía de interpretación: España S.A 1-80.
- [6]. RODRÍGUEZ, E.; GAMBOA, M.; HERNÁNDEZ, F.; GARCÍA, J. (2005) *Bacteriología general: principios y prácticas de laboratorio*. San José-Costa Rica. Universidad de Costa Rica. 2005. p. 107.
- [7]. MACFADDIN, J. (2003). *Pruebas bioquímicas para la Identificación de bacterias de importancia clínica*. 3ª edición. Buenos Aires-Argentina: pp. 470, 595-632, 676-682
- [8]. BARROW, G.; FELTHAM, R. *Cowan and Steel's Manual for Identification of Medical Bacteria*. 3ª ed. Cambridge-Inglaterra. Cambridge University Press. 1993. p. 203.
- [9]. BAUER, A.; KIRBY, W.; SHERRY, J.; TURCK, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing; by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45: 493-496.
- [10]. FLORES, M.; ZAVALETA, A.; CHAVEZ, E. (2010). "Bacterias halo tolerantes con actividad lipolíticas aisladas de las Salinas de Pilluana-San Martín". *Ciencia e Investigación*. 13 (2): 88-92.
- [11]. DE LA ROSA, M. C., ANDUEZA, F., SÁNCHEZ, M. C., RODRÍGUEZ, C., & MOSSO, M. A. (2004). Microbiología de las aguas mineromedicinales de los Balnearios de Jaraba. *Anal. Real Acad. Nac. Farm*, 70, 521-542.
- [12]. DE LA ROSA, M.C.; PINTADO GARCÍA, C.; RODRÍGUEZ FERNÁNDEZ, C. (2015). Microbiología del agua mineral del balneario Villa de Olmedo. Valladolid. España. *Anal. Real Acad. Nac. Farm* 81, Núm. 5.
- [13]. DE LA ROSA, M.C.; MOSSO, M.A. (2000). Diversidad microbiana de las aguas minerales termales. En: *Panorama actual de las aguas minerales y minero-medicinales de España*, pp. 153-158. Ed. A. López y J.L. Pinuaga. Instituto Tecnológico Geo minero de España. Madrid. España.
- [14]. BAKER, G.; GAFFAR, S.; COWAN, D.; SUHARTO, A. (2001). Bacterial community analysis of Indonesian hot springs. *FEMS. Microbiol. Lett.* 200: 103-109.
- [15]. LECLERC, H.; DA COSTA, M. (2004). Microbiology of natural mineral waters. In: *Technology of Bottled water*. 2th Ed. (Ed. Senior and Dege). Blackwell. Publishing. Boston. USA.
- [16]. ROSENBERG, F.; HERNÁNDEZ-DUQUINO, H. (1989). Antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* from German mineral waters. *Tox. Ass.* 4: 281-294.
- [17]. MASSA, S.; PETRUCCIOLI, M.; FANELLI, M.; GORI, L. (1995). Drug resistant bacteria in non-carbonated mineral waters. *Microbiol. Res.* 150: 403-408.
- [18]. MARY, P.; DEFIVES, C.; HORNEZ, J. (2000). Occurrence and multiple antibiotic resistance profiles of non-fermentative Gram-negative microflora in five brands of non-carbonated French bottled spring water. *Microb. Ecol.* 39: 322-329.
- [19]. MESSÍ, P.; GUERRIERI, E.; BONDI, M. (2005). Antibiotic resistance and antibacterial activity in heterotrophic bacteria of mineral water origin. *Sci. Total Environ.* 346: 213-219.
- [20]. KROVACEK, K.; PETERZ, M.; FARIS, A.; MANSSON, Y. (1989). Enterotoxigenicity and drug sensitivity of *Aeromonas hydrophila* isolated from well water in Sweden: a case study. *Int. J. Food Microbiol.* 8:149-154.
- [21]. DANTE, G.; SOMMER, M. (2014). Genética de la resistencia microbiana. *Investigación*.