

Acción inhibitoria de la fase líquida del fango del volcan Copahue, Neuquen, Argentina sobre la microbiota de piel, fosas nasales, intestinales y vaginal

Daniel DE MICHELE¹, Mónica DELFINA SPARO², Marta GIACOMINO¹,
Celia María SCHELL², María Marta DE LUCA², Silvia GRENÓVERO¹,
Andrés BELDERRAIN¹ y Juan Ángel BASUALDO²

¹Departamento de Postgrado Facultad de Ciencias de la Salud.
Universidad Nacional de Entre Ríos
3260 - Concepción del Uruguay, Entre Ríos, Argentina

²Cátedra de Microbiología y Parasitología. Facultad de Ciencias Médicas
Universidad Nacional de La Plata
1900 – La Plata, Argentina
Correo electrónico: jabasua@atlas.med.unlp.edu.ar

RESUMEN

El objetivo del trabajo fue determinar la actividad inhibitoria de la fase líquida (FL) del fango termal de Copahue, Neuquén, Argentina, sobre la microbiota de piel, fosas nasales, intestinal y vaginal. Las cepas utilizadas fueron *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*. Las muestras de fango se obtuvieron de 5 sitios de la Laguna Sulfurosa. La actividad inhibitoria de la FL se demostró utilizando pruebas de difusión en agar y velocidad bactericida. Con la prueba de difusión en agar se observó halo inhibitorio para *S. aureus* y *C. albicans* y no se visualizó para *S. epidermidis* y *E. faecalis*. El estudio dinámico de la actividad sobre *S. aureus*, *E. faecalis* y *C. albicans* demostró acción bactericida (disminución > 3 log.) a las 6 horas de exposición y recrecimiento con incubación de 24 h. En *S. epidermidis* se observó acción bactericida a las 4 horas. La discordancia entre la prueba de difusión y la velocidad bactericida demostró la escasa sensibilidad de las técnicas cualitativas por difusión para establecer la sensibilidad o resistencia de los diferentes microorganismos a la FL. Es el primer trabajo que demuestra la acción inhibitoria de la FL del fango sobre las cepas ensayadas

Palabras clave: Peloide, barro, acción inhibitoria, Copahue

Inhibitory effect of the liquid phase of Copahue Volcano mud
(Neuquen, Argentina) on skin, nostrils, intestinal and vaginal microbiota

ABSTRACT

The objective of this study was to determine the inhibitory effect of the liquid phase (FL) of Copahue Thermal Mud (Neuquen, Argentina) on skin, nostril, intestinal, and vaginal microbiota. *Staphylococ-*

cus aureus, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* were used. The mud samples came from five different places of the "Sulphurous Lake". Diffusion in Agar and Bactericidal rate tests were used to measure the FL inhibitory effect. The diffusion in Agar Test showed inhibition for *S. aureus* and *C. albicans* and no inhibition for *S. epidermidis* and *E. faecalis*. The dynamic activity study on *S. aureus*, *E. faecalis* and *C. albicans* showed bactericidal effect (reduction >3 log.) six hours after the exposition and growth with a 24-hours incubation period. *S. epidermidis*'s bactericidal effect was seen after four hours. The difference observed between the results of the diffusion test and the bactericidal inhibition test shows the low sensitivity of qualitative diffusion techniques in order to establish the sensitivity or resistance of different microorganisms in the LP. This has been the first paper that has studied the inhibitory effect of FL mud on the mentioned microorganisms.

Key words: Peloid, mud, inhibitory effect Copahue

INTRODUCCIÓN

Desde un punto de vista físico-químico los peloides (del griego *pelos* = fango, barro) son considerados sistemas dispersos heterogéneos, termodinámicamente inestables, en los que el medio de dispersión es agua mineral y la fase dispersa es una mezcla de sólidos orgánicos e inorgánicos.

La Sociedad Internacional de Hidrología Médica los define como productos naturales formados por la mezcla de agua mineral, incluida la del mar o lagos salados, con materias orgánicas o inorgánicas, resultantes de acciones geológicas y/o biológicas utilizados en terapéutica¹.

Hace más de 25 siglos que se conocen empíricamente algunas propiedades antiflogísticas y antibacterianas de los fangos minerales². En los últimos 15 años han comenzado a reportarse resultados de investigaciones sobre los mecanismos de acción local y sistémica de los fangos sobre la fisiología y patologías humanas³.

Los peloides han resultado ser aptos en tratamientos de enfermedades reumáticas degenerativas como la artrosis o la espondilitis y el reumatismo de partes blandas⁴, afecciones de la piel (psoriasis, acné, etc.)⁵⁻⁶⁻⁷⁻⁸, como tratamiento en infecciones de heridas quirúrgicas de pared abdominal y con fines estéticos⁹⁻¹⁰⁻¹¹.

El Complejo Termal de Copahue se sitúa a 1580 km. de Buenos Aires y a unos 1980 metros sobre el nivel del mar, a 18 Km. del volcán Copahue ("lugar del azufre") sobre la cordillera de los Andes, en la provincia de Neuquén, Argentina.

En dicho Complejo Termal, se encuentra una laguna al aire libre llamada Laguna Sulfurosa o Laguna Madre, no apta para baños de inmersión ya que su temperatura es próxima a los 70 °C y en algunos de sus borbotones puede alcanzar hasta 90 °C.

En su fondo se deposita el fango gris. Los peloides o fangos volcánicos de Copahue, son una mezcla natural de agua mineral con materias orgánicas e inorgánicas, resultante de procesos geológicos biológicos enriquecidos por numerosos hervideros. Armijo Castro y col. (2006) informaron que el 44% de la masa de fango de Copahue constituye su fase sólida. Entre los elementos hallados en el examen químico del material sobresalen azufre, silicio, oxígeno y aluminio¹².

Accorinti y col. (1995) han estudiando las aguas del volcán Copahue y diferentes especies de algas sulfurosas termófilas de las termas de la provincia del Neuquén y han podido aislar algunos de sus componentes activos con propiedades antibióticas y antiinflamatorias¹³. Sin embargo, aún no se ha analizado la actividad antimicrobiana del fango gris de Copahue sobre la microbiota habitual y patógena del hombre.

Ma'or y col (2006) han sugerido que ciertos fangos hipersalinos del Mar Muerto tendrían una posible acción antimicrobiana¹⁴.

El objetivo de este estudio fue investigar la actividad inhibitoria de la fase líquida (FL) del fango termal de Copahue sobre la microbiota de la piel, de las fosas nasales, intestinal y vaginal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Origen de las cepas

Las cepas utilizadas en este estudio fueron provistas por el Hospital Ramón Santamarina de la ciudad de Tandil, Provincia de Buenos Aires, Argentina.

La tipificación se realizó por pruebas bioquímicas convencionales¹⁵.

Las cepas seleccionadas fueron *Staphylococcus aureus* recuperado de fosas nasales de paciente al cual se le realizó estudio de portación para profilaxis preoperatoria cardiovascular (by-pass), *Staphylococcus epidermidis* recuperado de piel de antebrazo de paciente ambulatorio, *Enterococcus faecalis* recuperado de materia fecal de paciente ambulatorio y *Candida albicans* aislada de contenido vaginal de paciente ambulatoria.

Las cepas se almacenaron a -70 °C en caldo cerebro corazón (Laboratorio Britania, Argentina) con glicerol al 20%.

Lugar y toma de muestra del fango gris de Copahue

Las muestras de fango, en un total de 5, se obtuvieron de la Laguna Sulfurosa o Laguna Madre ubicada dentro del Complejo Termal de Copahue, a 70 cm. de profundidad.

Las tomas de muestra de fango fueron realizadas por el personal del Ente Provincial de las Termas desde la vereda perimetral (borde de la laguna).

La extracción se hizo utilizando grandes azadas que fueron sumergidas hasta el fondo para atrapar el fango y luego fueron izadas hasta la superficie.

Las muestras se recogieron en recipientes estériles de boca ancha en sus respectivos contenedores, para optimizar su traslado (Foto 1).



Foto 1. Toma de muestra del fango gris de la laguna Madre de Copahue, Neuquén Argentina

Metodología de trabajo

El fango fue esterilizado en autoclave durante 5 minutos, a 121 °C, a 1 atmósfera de presión. Un volumen de la muestra se dejó sedimentar a temperatura ambiente durante 24 horas, para separar la fase sólida de la líquida.

Los ensayos de inhibición se efectuaron con la FL del fango. Su almacenamiento fue a 4 °C.

Pruebas de inhibición

La prueba de sensibilidad *in vitro* cualitativa se realizó mediante la técnica de difusión utilizando discos de papel de filtro estéril, de 10 mm de diámetro, embebidos con 45 ml de la FL.

Los mismos se almacenaron en desecador a temperatura ambiente y a 4 °C.

Para la realización de la prueba se utilizó el método estandarizado para antimicrobianos en medio agar Mueller Hinton (Laboratorios Britania, Argentina).

Para cada cepa estudiada se utilizaron inóculos bacterianos a concentraciones de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml¹⁶.

La velocidad bactericida se realizó mediante la técnica de curva de muerte microbiana sin agitación, por el método estandarizado de *Killing curve*¹⁷.

Brevemente, se agregó 100 ml de cada cepa (inóculo aproximado de 1×10^4 UFC /ml), a volúmenes iguales de FL y de caldo Mueller Hinton (Laboratorios Britania, Argentina) y se incubó a 35 °C. Las alícuotas se tomaron a 0, 2, 4, 6 y 24 horas (100 ml), realizando diluciones seriadas al décimo en NaCl 0,85 g%.

Los recuentos se realizaron en placas conteniendo agar Trypticasa Soya (Laboratorios Britania, Argentina). Las mismas se incubaron a 35 °C durante 18 horas en atmósfera ordinaria para su posterior lectura. Todos los experimentos fueron realizados por duplicado.

RESULTADOS

Efecto inhibitorio de discos impregnados con FL

Se observaron halos de inhibición alrededor de los discos en placas inoculadas con *S. aureus* y *C. albicans* (figura 1), no se observó halo inhibitorio para *S. epidermidis* y *E. faecalis*.

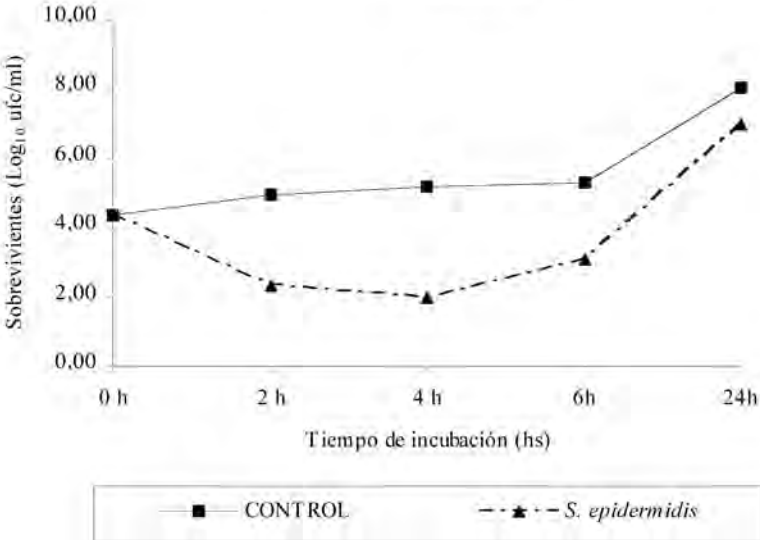


Figura 1. Efecto inhibitorio de discos impregnados con FL frente a *S. aureus* y *C. albicans* inoculados en placas de Agar Müller Hinton, incubadas a 35 °C por 24 h

Velocidad Bactericida de FL

Al enfrentar las suspensiones de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. faecalis* y *C. albicans* a la FL se observó una declinación rápida del recuento de colonias viables antes de las 6 horas (2 a 3 log), observándose un recrecimiento a las 24 horas. La FL mostró frente a *C. albicans* un efecto inhibitorio importante antes de los 30 minutos de contacto (Fig. 2 y 3).

Velocidad bactericida de la FL del fango termal de Copahue, Neuquén, Argentina frente a una cepa de *S. epidermidis* aislada de lesión de antebrazo



Velocidad bactericida de la FL del fango termal de Copahue, Neuquén, Argentina frente a una cepa de *S. aureus* aislada de fosa nasal

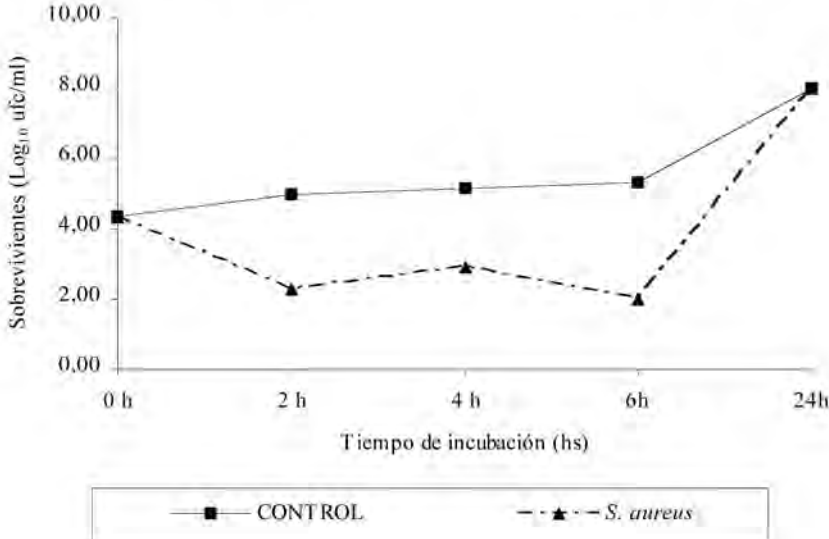
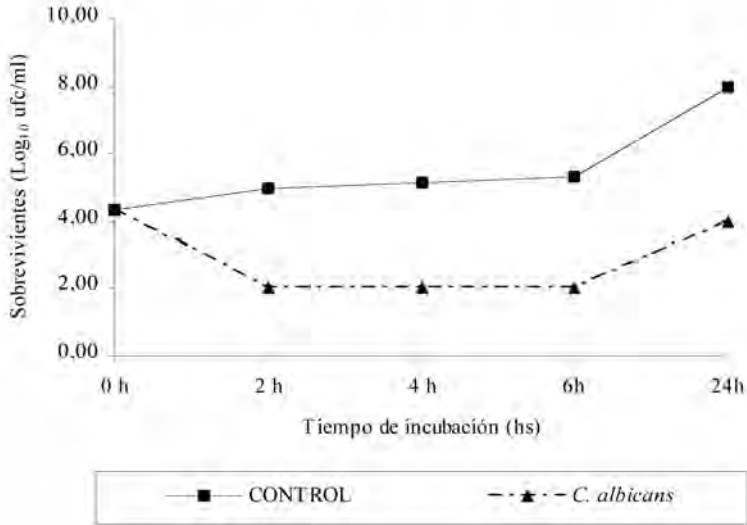


Figura 2. Velocidad bactericida de la FL del fango termal de Copahue, Neuquén, Argentina frente a cepas de *S. aureus* y *S. epidermidis*.

Velocidad bactericida de la FL del fango termal de Copahue, Neuquén, Argentina frente a una cepa de *C. albicans* aislada de contenido vaginal



Velocidad bactericida de la FL del fango termal de Copahue, Neuquén, Argentina frente a una cepa de *E. faecalis* aislada de materia fecal

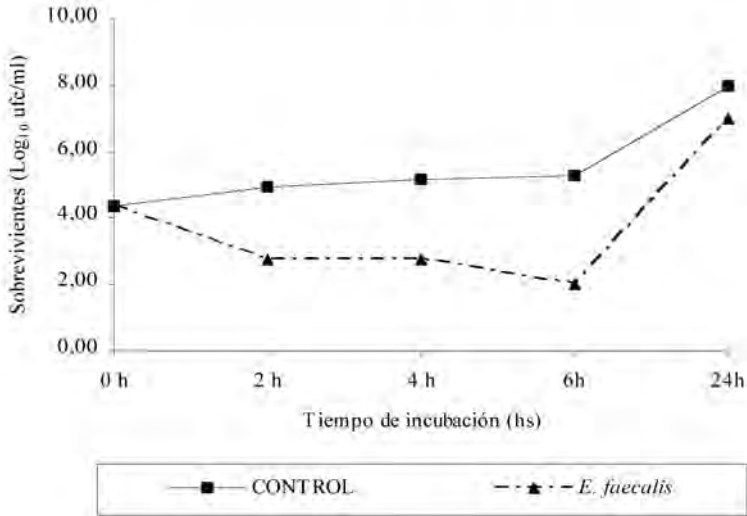


Figura 3. Velocidad bactericida de la FL del fango termal de Copahue, Neuquén, Argentina frente a cepas de *E. faecalis* y *C. albicans*.

DISCUSION

De los resultados de este estudio se desprende que la FL tiene una acción inhibitoria sobre todas las cepas ensayadas.

El estudio dinámico de la actividad sobre *S. aureus*, *E. faecalis* y *C. albicans* demostró una acción bactericida (disminución > 3 log) a las 6 horas de exposición, observándose un recrecimiento con la incubación prolongada hasta las 24 h. Este hecho sugiere el agotamiento del componente inhibitorio en el medio ya que cuando se repicaron las colonias del recrecimiento se observó sensibilidad a la FL (datos no mostrados). En *S. epidermidis* se observó una acción bactericida a las 4 horas (disminución > 3 log).

Este hecho sugiere el agotamiento del componente inhibitorio en el medio ya que cuando se repicaron las colonias del recrecimiento no se observó sensibilidad a la FL (datos no mostrados).

La discordancia encontrada entre la prueba de difusión y la velocidad bactericida demostró la escasa sensibilidad de las técnicas cualitativas por difusión para establecer la sensibilidad o resistencia a los diferentes microorganismos ensayados. Este hecho está avalado por la utilización en ambos ensayos de técnicas estandarizadas por organizaciones internacionales como National Committee for Laboratory Standards (NCCLS) y Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Por otro lado los estudios de *Killing curves* permitieron establecer el tiempo óptimo de contacto con la FL, evitando exposiciones excesivas.

Las terapias naturales ofrecerían una alternativa no tóxica, para la prevención, descolonización y tratamiento de infecciones leves que pueden constituir en un futuro infecciones oportunistas sistémicas severas en el hombre. Por lo tanto el aprovechamiento de la actividad inhibitoria de los peloides o fangos puede ser una alternativa en la prevención de colonización de microorganismos que provocan enfermedades invasivas como *S. aureus* con multirresistencia antibiótica asociada, patógenos emergentes como enterococos (*E. faecalis*, *E. faecium*) y levaduras como *C. albicans*, de las cuales algunas cepas emergentes son portadoras de resistencia a imidazólicos.

Es el primer trabajo que demuestra la acción inhibitoria de la FL del fango del volcán Copahue en todas las cepas microbianas ensayadas.

AGRADECIMIENTOS

Ente Provincial de Termas de Neuquen (Eproten) Argentina. El presente trabajo ha sido financiado por la Universidad Nacional de Entre Ríos N PID N°10045-2 UNER

BIBLIOGRAFÍA

- 1 Viseras C, Cerezo P. Aplicación de peloides y fangos termales. En: AETS. Técnicas y Tecnologías en Hidrología Médica e Hidroterapia. Madrid: ISCIII, 2006: 141-146.

- 2 Knüsel O. Balneology - myth versus reality. *Ther Umsch* 2001; 58(8): 465-469.
- 3 De Michele D, Giacomino M, Untura M, Belderrain A. Efectos sistémicos de los fangos minerales. Revisión de la literatura de los últimos 10 años. *An Hidrol Med* 2006; 1: 135-142
- 4 Constant F, Collin JF, Guillermin F, Boulagé M. Effectiveness of spa therapy in chronic low back pain: a randomized clinical trial. *J Rheumatol* 1995; 22(7): 1315-1320.
- 5 Alvarez G. Contribución al estudio de las termas de Copahue (Neuquén), en sus aplicaciones dermatológicas. *Bol Asoc Med Argent* 1938; 4: 220.
- 6 Ubogui J, Ficooseco H. Ulceras por decúbito e hidroterapia en las termas de Copahue. *Arch Arg Dermatol* 1990; 40: 393-399.
- 7 Ubogui J, Rodríguez-Lupo L, Ficooseco H, Sevinsky L, Kien K, Stengel F. Terapéutica no convencional de la Psoriasis en las termas de Copahue (Neuquén Argentina). Experiencia preliminar. *Arch Arg Dermatol* 1991, 41: 25-39.
- 8 Ubogui J. Balneology for Psoriasis in Argentina. Alternative or complementary dermatologic therapy at Copahue Thermal Basins Complex. Proceedings of the 35 th Congress of the International Society of Medical Hydrology & Climatology; 2006 Jun 6-7; Istanbul, Turquía. 2006. 77.
- 9 Perea Hornos M. Afecciones reumatológicas y del aparato locomotor. En: AETS. Técnicas y Tecnologías en Hidrología Médica e Hidroterapia. Madrid: ISCIII, 2006: 51-72.
- 10 García Matas, A. Afecciones Alérgicas. En: AETS. Técnicas y Tecnologías en Hidrología Médica e Hidroterapia. Madrid: ISCIII, 2006:135-140.
- 11 Meijide Failde R, Mourelle Mosqueira L. Afecciones dermatológicas y cosmética dermotermal. En: AETS. Técnicas y Tecnologías en Hidrología Médica e Hidroterapia. Madrid: ISCIII, 2006:175-194.
- 12 Armijo F, Ubogui J, Corvillo I, Maraver F. Estudio de los peloides de las termas de Copahue (Neuquén-Argentina): características y propiedades. *Bol Soc Esp Hidrol Med* 2006; 21(I): 9-13.
- 13 Accorinti J, Wenzel M. Biological essays in Argentine thermal algal. *Dominguezia* 1995; 12: 7-15.
- 14 Ma'or, Z. Henis, Y., Alon, Y., Orlov, E., Sørensen, KB., Oren, A. Antimicrobial properties of Dead Sea black mineral mud. *Int J Dermatol* 2006; 45(5): 504-511.
- 15 Murray, P., Baron, E., Pfaller, M., Tenover, F., Tenover, R. *Manual of Clinical Microbiology* 7 th Ed. American Society for Microbiology. Washington DC. 1999.
- 16 Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for disk diffusion antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. Fifteenth International Supplement. 2005a. M100 S15, Vol 25 (1). CLSI, Waine, Pennsylvania, USA. Disponible en URL: www.nccls.org
- 17 National Committee for Laboratory Standards. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents. Document M26-A. NCCLS, Waine, Pennsylvania, USA. 1999. Disponible en URL: www.nccls.org