

Estudio de la actividad antimicrobiana del fango termal de Copahue (Neuquén, Argentina)

Basualdo, Juan A.*; Schell, Celia M.*; Sparo, Mónica D.*; Grenóvero, María S.**; Giacomino, Marta I.**; Belderrain, Andrés R.**; Monasterio, Ana M.***; De Michele, Daniel F.**; De Luca, María M.*

Resumen

Se investigó la actividad antimicrobiana del fango termal (Complejo Termal Copahue, Argentina) sobre microorganismos de la microbiota autóctona del hombre, agentes infecciosos de la comunidad, hospitalarios y cepas ATCC. Las cepas correspondieron a cocos Gram positivos, bacilos Gram negativos, levaduras y cepas ATCC. El fango se obtuvo de la Laguna Sulforosa. La actividad inhibitoria se demostró utilizando fase líquida (FL) mediante la prueba de difusión en agar y por estudios de cinética bactericida. Con la primera se observó halo inhibitorio frente a *Staphylococcus aureus* y *Cándida albicans*, no visualizándose inhibición para el resto de los microorganismos. El estudio dinámico a través del tiempo sobre *S. aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermis* y *C. albicans* demostró acción inhibitoria antes de las 6 hs de incubación, mientras que no se observó inhibición frente a los bacilos Gram negativos. Es el primer trabajo que demuestra la actividad antimicrobiana de la FL sobre las cepas ensayadas.

Palabras clave: salud, termalismo, actividad antimicrobiana, fango, Copahue

Se presentan los resultados del PID UNER 10045, desarrollado conjuntamente entre la Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Entre Ríos (UNER), Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de la Plata (UNLP) y el Ente provincial de las Termas de Neuquén (EPROTEN) (Argentina), financiado por UNER, Director: Dr. Juan Angel Basualdo Farjat; recibido en octubre 2010; admitido en agosto 2011.

Autores: *Cátedra de Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP (La Plata, Argentina). **Departamento de Posgrado, Facultad de Ciencias de la Salud, UNER (Concepción del Uruguay, Argentina). *** EPROTEN (Argentina). Contacto: jbasua@atlas.med.unlp.edu.ar

Study of the antimicrobial activity of thermal mud from Copahue (Neuquén, Argentina)

Abstract

The antimicrobial activity of thermal mud from Copahue Thermal Complex against microorganisms from human microbiota, community and hospital infections agents and ATCC strains was investigated. Thermal mud samples were obtained from Sulfurous Lagoon located within the Complex. To determine the antimicrobial properties of the liquid phase (LP) of Copahue thermal mud we used *in vitro* assays, agar diffusion test and bactericidal rate, using gram-positive cocci, gram-negative bacilli, yeast and ATCC strains. Inhibition zones around the disk against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* was showed with the first technique. No inhibition zones were observed for the rest of the microorganisms assayed. With the killing curve technique, inhibitory action before 6 h of incubation was observed against *S. aureus*, *E. faecalis*, *S. epidermidis* and *C. albicans* while there was no inhibition against gram negative bacillus. This is the first study that demonstrates the antimicrobial activity of LP on certain assayed strains.

Keywords: health, health spa, antimicrobial activity, mud, Copahue

Estudo da atividade antimicrobiana da lama termal de Copahue (Neuquén, Argentina)

Resumo

Investigou-se a atividade antimicrobiana da lama termal (Complejo Termal Copahue, Argentina) sobre microorganismos da microbiota autóctone do homem, agentes infecciosos da comunidade, hospitalares e cepas ATCC. As cepas corresponderam a cocos Gram positivos, bacilos Gram negativos, leveduras e cepas ATCC. A lama foi obtida da Laguna Sulfurosa. A atividade inibitória se demonstrou utilizando fase líquida (FL) mediante a prova de difusão em ágar e por estudos de cinética bactericida. Com a primeira se observou halo inibitório perante *Staphylococcus aureus* e *Cândida albicans*, não se visualizando inibição para o resto dos microorganismos. O estudo dinâmico através do tempo sobre *S. aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermis* e *C. albicans* demonstrou ação inibitória antes das 6 hs de incubação, enquanto não se observou inibição perante os bacilos Gram negativos. É o primeiro trabalho que demonstra a atividade antimicrobiana da FL sobre as cepas ensaiadas.

Palavras chave: saúde, termalismo, atividade antimicrobiana, lama, Copahue

I. Introducción

Las curas termales tienen sus antecedentes históricos desde épocas remotas. Estas curas empíricas, que aún hoy siguen vigentes, alcanzaron enorme difusión en las civilizaciones griega y romana y las civilizaciones indígenas en América realizaban estas prácticas entre sus rituales.

Se define como Termalismo Médico o Terapéutica Mineralomedicinal a una antigua modalidad que utiliza alguno o varios de los productos provenientes de yacimientos termales (aguas, fangos/peloides, vapores o algas), con indicaciones médicas precisas [1; 2]. El Consejo Ejecutivo de la Organización Mundial de la Salud estableció relaciones oficiales con la Federación Internacional de Termalismo Climatismo (FITEC) y reconoció oficialmente el tratamiento hidrotermomineral como una alternativa terapéutica en múltiples afecciones.

Por peloides (del griego *pelos*: fango, barro) se entienden los productos naturales (básicamente los sedimentos) que se depositan en el fondo de los lagos, pantanos, salinas, bahías y deltas, con determinadas propiedades térmicas, físico-químicas, antimicrobianas y otras. Las aguas termales pueden favorecer el desarrollo de fangos o barros (si el lecho de las fuentes no es absolutamente rocoso), vapores (en caso de altas temperaturas), diversos organismos vivos como algas productoras de sustancias biológicamente activas y bacterias, liberadoras de minerales al medio, entre otros [2]. La Sociedad Internacional de Hidrología Médica (ISMH) desde el año 1949 define a los peloides o fangos como un sistema disperso heterogéneo, termodinámicamente inestable, en el que el medio de dispersión es agua mineral y la fase dispersa es una mezcla de sólidos orgánicos e inorgánicos, resultantes de acciones geológicas y/o biológicas. Desde el punto de vista estructural, los peloides o fangos representan en sí un sistema físico-químico complejo, compuesto básicamente por tres partes íntimamente relacionadas: la fase líquida (FL) que es la solución acuosa, la fase sólida, compuesta por partículas gruesas, y el complejo coloidal, compuesto por partículas muy finas [3]. La composición iónica de la FL de los fangos, de la misma forma que su mineralización puede ser muy variada y depende fundamentalmente de la composición iónica de las aguas que cubren a los mismos. Entre el agua que cubre a los fangos y

la que se encuentra dentro de ellos ocurre permanentemente un proceso de difusión dirigido a establecer el equilibrio iónico-salino. Actualmente, los fangos son utilizados en tratamientos empíricos de enfermedades reumáticas degenerativas, reumatismo de partes blandas, afecciones de la piel, infecciones de heridas quirúrgicas de pared abdominal y también resultan muy eficaces en tratamientos dermatológicos estéticos, puesto que proporciona magnesio, cobre y zinc (productores de colágeno y elastina) y silicio [4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11; 12].

Los beneficios obtenidos en fangoterapia no dependen exclusivamente del elemento “agua y fango”, sino de una multiplicidad de estímulos químicos, físicos y biológicos [2]. Se conoce que los efectos químicos se encuentran relacionados con las sustancias que posee el fango, que a través de la piel pasan por ósmosis al torrente sanguíneo. Los efectos físicos suceden principalmente por la temperatura del fango, produciéndose una vasodilatación periférica, mejorando la oxigenación de los tejidos, con liberación de sustancias que producen efectos analgésicos [6; 12]. La presencia de diferentes minerales y oligoelementos y la combinación entre ellos aportan, en el caso de los fangos sulfurados, propiedades queratolíticas, antimicrobianas (antibacterianas y antifúngicas), antiinflamatorias e inmunomoduladoras [6].

La existencia de diferentes variedades de algas termófilas enriquece a las aguas y fangos por la liberación al medio de sus productos activos tales como estimulantes de la cicatrización (alginato de calcio) y algunos esteroides, entre otros [6, 12]. Sin embargo, se conoce muy poco sobre las propiedades del fango en relación con su presunta acción antimicrobiana.

En Argentina se encuentra uno de los principales centros termales: el Centro Termal de Villa Copahue (“lugar del azufre”). Este se sitúa en una pequeña región de la Cordillera Norpatagónica, en la Provincia de Neuquén, a unos 1980m sobre el nivel del mar. Su distancia a Villa Caviahue es de 18km, a Neuquén Capital de 360km y a Capital Federal más de 1500km. Las termas de Copahue sorprenden por la gran diversidad de aguas existentes en diversas lagunas. En el fondo de estas lagunas se encuentran barros calientes: barro gris plomo en la Laguna del Chancho, barro gris oscuro que corresponde al barro ácido de la Laguna Verde y

el barro gris que forma el piso fangoso de la Laguna Sulfurosa. Estos barros o fangos se componen principalmente de azufre, silicio, oxígeno y aluminio. El burbujeo constante de vapores y gases les va incorporando azufre, que se encuentra en forma de elemento y de sulfato de aluminio y potasio. Poseen propiedades bacteriostáticas y antimicóticas [13; 14]. Los fangos sulfurados son los que tienen mayores aplicaciones dermatológicas, especialmente en el tratamiento de la psoriasis, consiguiéndose una reducción de las manifestaciones clínicas como la descamación y el prurito, así como el componente eritematoso.

En Argentina, han sido investigadas diferentes especies de algas termófilas provenientes de las aguas de las lagunas del Complejo Termal de Copahue, de donde se han podido aislar principios bioactivos con efectos antimicrobianos. Acorinti [15] y Squadrone [16] han descrito propiedades antimicrobianas del agua del volcán Copahue sobre diferentes microorganismos y de Michele [17] y Schell [18] han estudiado la acción inhibitoria *in vitro* de la fase líquida del fango termal de Copahue sobre microorganismos de la microbiota humana. Sin embargo, son muy escasos los estudios que hacen referencia a la acción antimicrobiana de los fangos utilizados *in vivo*. Ensayos clínicos realizados por Rodríguez Ramírez [8; 9] utilizando barros de la Salinas de Frank País García de Guantánamo, Cuba, en heridas quirúrgicas infectadas, demostraron la alta eficacia *in vivo* de dichos peloides sulfurados frente a bacilos gram negativo y cocos gram positivos.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad antimicrobiana del fango termal de Copahue, obtenido de la laguna Sulfurosa del Complejo Termal de Copahue, en Neuquén.

II. Materiales y Métodos

II.1. Área de estudio

El complejo termal de Copahue se encuentra a casi 2.000m s.n.m., encerrado en una especie de olla rodeada de cerros, desde donde fluyen vertientes de agua y vapores sulfurosos. Es un centro termal único en América por la variedad y calidad de sus aguas, fangos y algas, que poseen distintas propiedades terapéuticas de acuerdo al grado de mineralización

que contengan. Las instalaciones en la pequeña Villa al pie del volcán cuentan con un edificio de balneoterapia con una capacidad de más de 2.000 baños/día, y una infraestructura hotelera para albergar a 400 personas. Este complejo administrado por el Ente Provincial de Termas de Neuquén (EPROTEN) tiene como objetivo el de administrar y proteger el recurso termal.

Las Termas de Copahue sorprenden por la gran diversidad de aguas existentes. Como ya se ha mencionado, existen dentro del mismo lagunas al aire libre tales como la Laguna Verde, la del Chanco y la Sulfurosa o Madre.

II.2. Toma de muestra del fango del Complejo Termal de Copahue

Las muestras fueron tomadas del fondo de la Laguna Sulfurosa o Laguna Madre (ubicada dentro del Complejo de Villa Copahue), en un total de 18, durante los meses estivales, debido a que la temporada en Copahue se extiende desde diciembre a abril, dependiendo de las condiciones climáticas.

La laguna Madre es una laguna hipertermal que no resulta apta para baños de inmersión, ya que su temperatura es próxima a los 70°C y alcanza 85°C a 90°C en las salidas de numerosas fumarolas que se alojan en el fondo. En su suelo se origina el fango gris.

La recolección de la muestra estuvo a cargo del personal del EPROTEN y se realizó desde la vereda perimetral (borde de la laguna). La extracción se hizo utilizando grandes azadas que fueron sumergidas hasta el fondo, aproximadamente a 70 cm de profundidad, para atrapar el fango. Luego fueron izadas hasta la superficie. Las muestras se recogieron en recipientes estériles de boca ancha y fueron colocadas en sus respectivos contenedores para optimizar su traslado, el cual se efectuó a temperatura ambiente.

II.3. Recolección y re-tipificación de cepas

Las cepas utilizadas en este estudio fueron:

- a. Cepas de colección ATCC.
- b. Cepas provistas por el Laboratorio de Bacteriología del Hospital “Ramón Santamarina” de la ciudad de Tandil, Provincia de Buenos Aires,

donde funciona la subsección de la Cátedra de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP). Estas cepas fueron recuperadas de la microbiota autóctona de pacientes de la comunidad y hospitalarios asistidos en dicho nosocomio.

Las cepas fueron caracterizadas fenotípicamente por pruebas bioquímicas convencionales y almacenadas por duplicado a -20°C en caldo cerebro corazón (BHI, Britania) con glicerol al 20%. Para la tipificación fenotípica de bacilos gram negativos de fácil desarrollo fermentadores y no fermentadores de glucosa y para cocos gram positivos catalasa positiva y catalasa negativa se siguieron los protocolos establecidos según bibliografía [19]. Las mismas se descongelaron y luego de dos repiques sucesivos en caldo BHI se procedió a su caracterización fenotípica para confirmar su especie y su pureza.

Las cepas se acondicionaron para ser enviadas al laboratorio de la Cátedra de Microbiología y Parasitología de la UNLP, de acuerdo a las normas de bioseguridad vigentes para el transporte de microorganismos viables, y fueron remitidas en cultivos de 18 horas en columna de agar cerebro corazón. Una vez recibidas en el laboratorio de la Cátedra, fueron re-tipificadas y almacenadas en caldo cerebro corazón con glicerol al 20% a -70°C .

En la **Tabla N° I** se describe la frecuencia de cepas según género y especie utilizadas en este estudio.

II.4. Ensayos para determinar actividad antimicrobiana

Debido a la escasa o nula difusión encontrada en estudios previos al utilizar la prueba por disco para demostrar actividad antimicrobiana con fango crudo, y teniendo en cuenta que el fango, desde el punto de vista físicoquímico, es considerado un sistema heterogéneo compuesto por una fase líquida (FL) y una fase sólida, se decidió realizar los ensayos de inhibición utilizando la FL del mismo, obtenida por sedimentación a temperatura ambiente por 24 horas. Posteriormente, la FL fue esterilizada a 121°C , 1 atmósfera de presión, durante 5 minutos, y almacenada a 4°C (**Fotografía 1**).

TABLA N°1. Frecuencia de cepas empleadas para los estudios de actividad antimicrobiana utilizando la FL del fango termal de Copahue

Cepas	Genero y especie	n
Cocos Gram (+)	<i>Staphylococcus aureus</i> MS*y MR**	10
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	19
	<i>Enterococcus faecalis</i>	9
Bacilos Gram (-)	<i>Escherichia coli</i> no EVEC***	33
	<i>Proteus mirabilis</i>	2
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	2
	<i>Citrobacter freundii</i>	1
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	1
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	1
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2
Levaduras	<i>Candida albicans</i>	7
	<i>Rhodotorula</i> spp.	19
Total		90

*MS: metilino sensible. **MR: metilino resistente. ***EVEC: enterovirulenta *E. coli*



FOTOGRAFÍA 1. Fase líquida del fango termal de Copahue obtenida por sedimentación durante 24 h

II.4.1. Prueba de sensibilidad in vitro cualitativa

Estos ensayos de inhibición se realizaron por triplicado. Se empleó la técnica de difusión estandarizada por el Clinical and Laboratory Standards Institute [20], utilizando discos de papel de filtro estéril, de 10 mm de diámetro embebidos con 45 μ l de la fase líquida obtenida por sedimentación. Los discos fueron almacenados en desecador a temperatura ambiente. Los inóculos utilizados para cada cepa estudiada fueron de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml correspondiendo al 0.5 de la escala de Mc. Farland.

Se ensayaron cepas de *S. aureus* (MS y MR) *S. epidermidis*, *E. faecalis*, Bacilos gram negativos fermentadores y no fermentadores de la glucosa, así como levaduras de interés médico.

II.4.2. Técnica de curva de muerte microbiana

Para estimar la cinética bactericida se utilizó la técnica de curva de muerte microbiana sin agitación, por el método estandarizado de *Killing curve* recomendado por el National Committee for Laboratory Standards [21; 22]. Se agregaron 100 μ l de cada microorganismo (inóculo aproximado de 1×10^4 UFC /ml previamente estandarizado), a volúmenes iguales de FL y de caldo Müeller Hinton (Lab. Britania) y se incubaron en atmósfera ordinaria. Las alícuotas fueron tomadas a las 0, 2, 4, 6 y 24 h (100 μ l), realizando diluciones seriadas al décimo en NaCl 0,85 g% para realizar los recuentos en placas conteniendo agar Tripticasa Soya (Lab. Britania), las cuales fueron incubadas en atmósfera ordinaria para su posterior lectura. La totalidad de los experimentos se realizaron por triplicado.

Se ensayaron cepas de *S. epidermidis*, *S. aureus* MS y MR, *E. faecalis* (como representantes de cocos gram positivos); *E. coli* no EVEC y *Acinetobacter baumannii* (como representantes de bacilos gram negativos) y *C. albicans* como representante de levaduras de interés médico.

II.4.3. Criterio de selección de cepas para estudios de curva de muerte

Para evaluar el comportamiento de otras cepas de *S. aureus*, se realizó un estudio comparativo. El criterio de selección fue utilizar aquellas cepas que presentaron zona clara de inhibición de crecimiento alrede-

dor de los discos \leq a 10 mm. Estas fueron recuperadas de pacientes provenientes de la comunidad y hospitalarias.

Un grupo de cepas de *E. coli* tomadas al azar fueron estudiadas por la misma técnica.

III. Resultados

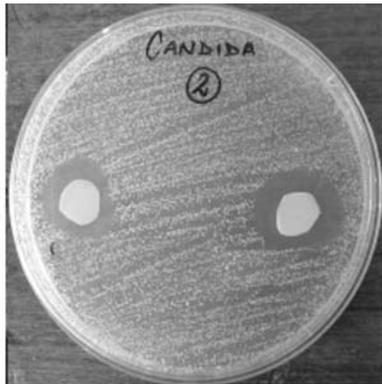
III.1. Prueba de sensibilidad in vitro cualitativa

Se obtuvieron halos de inhibición alrededor de los discos en las placas inoculadas con *S. aureus* (12 mm) y *C. albicans* (18 mm) (**Fotografías 2 y 3**). No se observó halo inhibitorio frente a *S. epidermidis* y *E. faecalis*.

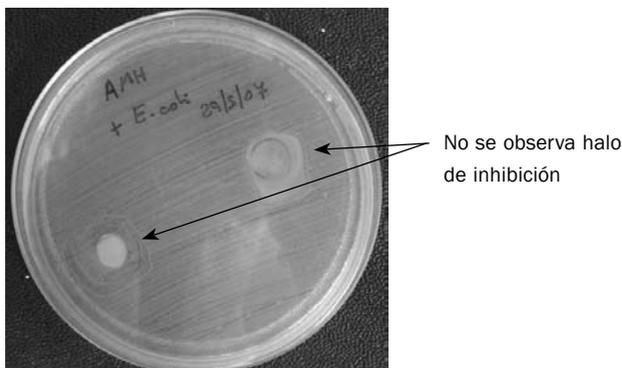
Frente a bacilos Gram negativos ensayados, fermentadores y no fermentadores de la glucosa, provenientes de la comunidad y del medio hospitalario, no se observó halo inhibitorio (**Fotografía 4**).



FOTOGRAFÍA 2. Efecto inhibitorio de discos impregnados con FL en placa de Agar Müller Hinton inoculada con *S. aureus*, incubada a 35 °C por 24 h



FOTOGRAFÍA 3. Efecto inhibitorio de discos impregnados con FL en placa de Agar Müller Hinton inoculada con *C. albicans*, incubada a 35 °C por 24 h



FOTOGRAFÍA 4. Placa con Agar Müeller-Hinton inoculada con *E. coli* no EVEC. Se observan discos impregnados con fango crudo y FL sin halo inhibitorio

III.2. Técnica de curva de muerte microbiana

Al enfrentar 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 h (caída en el orden de 2 a 3 log). Transcurridas las 24 hs se visualizó un recrecimiento microbiano (**Gráficos 1 y 2**). Para verificar el posible agotamiento del componente inhibitorio contenido en la FL y descartar la existencia de colonias resistentes, se repicaron las cepas recrecidas a las 24 horas y se las enfrentó nuevamente a la FL observándose idéntico comportamiento al descrito anteriormente.

No se observó inhibición de crecimiento a través del tiempo con la técnica de *Killing curve* frente a los siguientes microorganismos: *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter freundii* y *Enterobacter aerogenes*. *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 25923 fueron utilizados como cepas controles.

Con el estudio comparativo de cinética bactericida para las cepas de *S. aureus* seleccionadas (ver criterio de selección) se observó un comportamiento similar al encontrado en la primer cepa de *S. aureus* analizada. Con el mismo se comprobó efecto inhibitorio antes de las 4 hs (**Gráficos 3 y 4**).

Cabe aclarar que, en una primera etapa, se decidió diseñar la curva realizando recuentos hasta las 24 horas de incubación. En etapas posteriores, y debido a resultados encontrados y analizados, se decidió

acortar el tiempo de incubación a 8 horas para la realización de curvas posteriores.

No se observó inhibición del crecimiento a través del tiempo con las cepas de bacilos Gram negativos ensayadas (**Grafico 5**).

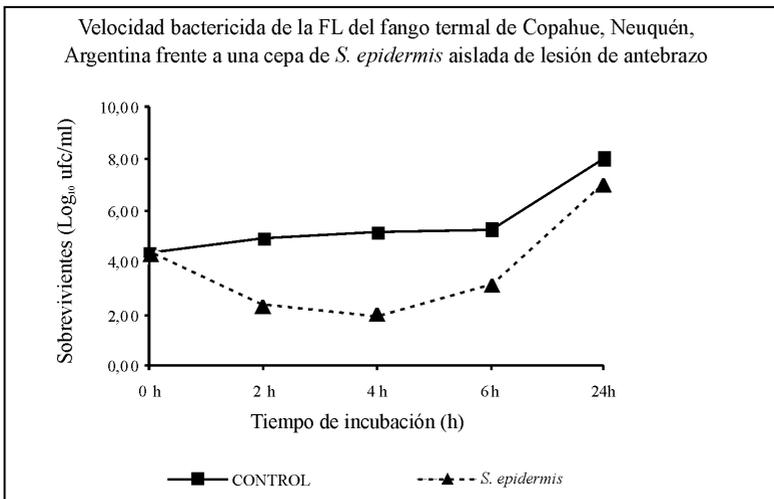
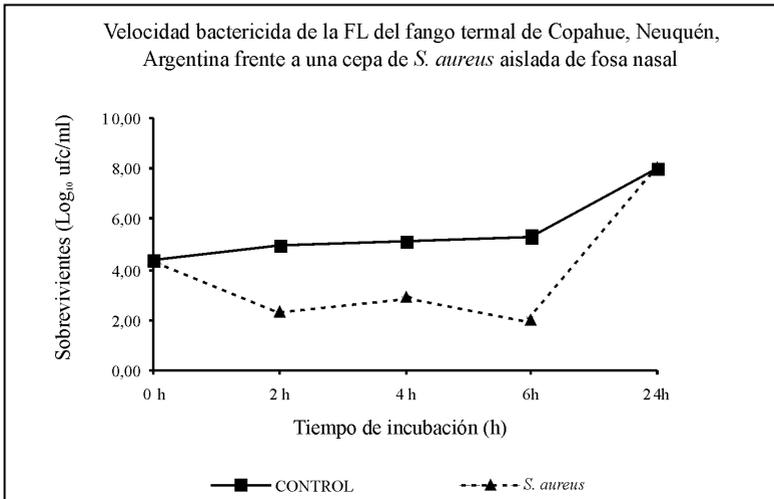


GRÁFICO 1. Cinética de inhibición de la fase líquida del fango termal de Copahue frente a cepas de *S. aureus* y *S. epidermidis*

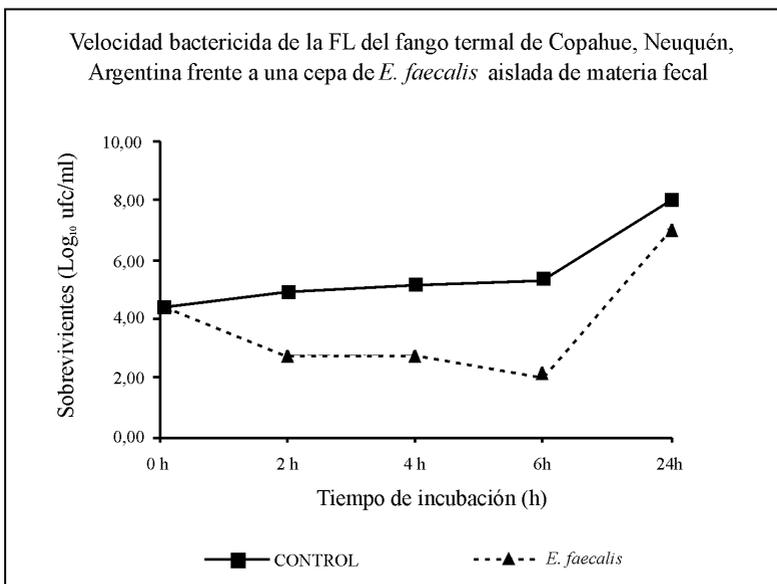
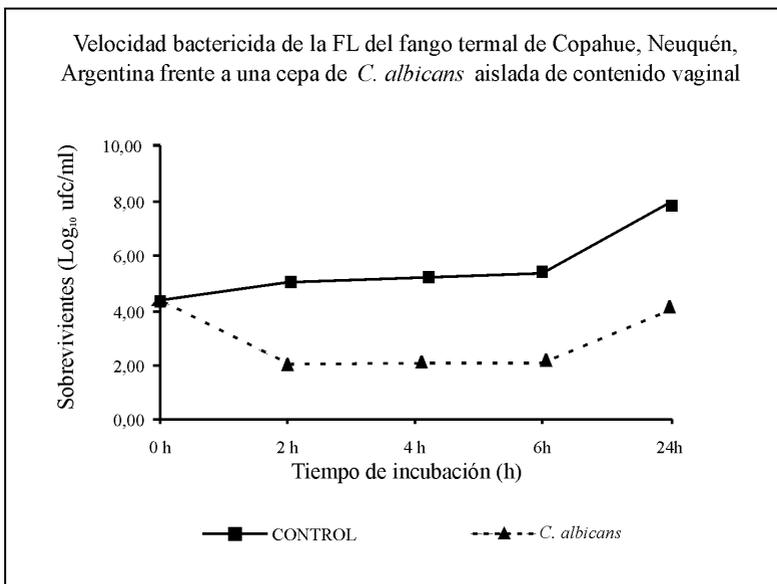


GRÁFICO 2. Cinética de inhibición de la fase líquida del fango termal de Copahue frente a cepas de *E. faecalis* y *C. albicans*

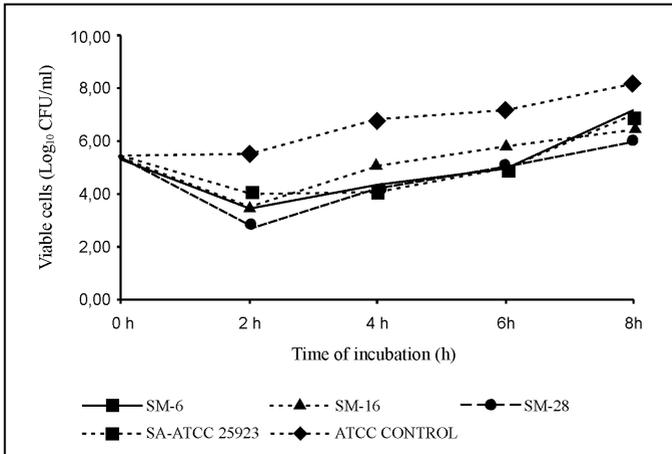


GRÁFICO 3. Cinética de inhibición de cepas de *S. aureus* aisladas de pacientes de la comunidad frente a FL del fango termal de Copahue

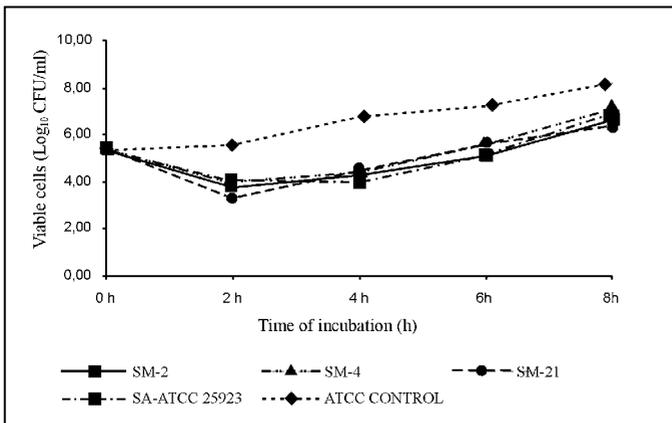


GRÁFICO 4. Cinética de inhibición de cepas de *S. aureus* aisladas de pacientes hospitalarios frente a FL del fango termal de Copahue

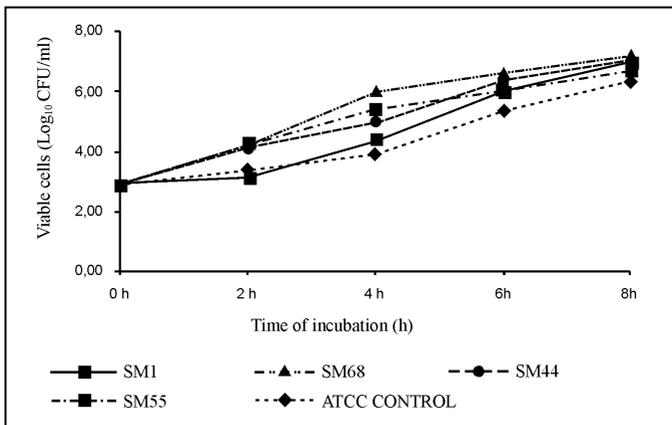


GRÁFICO 5. Cinética de inhibición de cepas de *E. coli* frente a FL del fango termal de Copahue

IV. Discusión y conclusiones

A pesar de la escasa sensibilidad conocida, evento común, que presentan las técnicas de difusión en placa, debido a posibles factores como composición del medio de cultivo, cantidad del inóculo bacteriano y otros, que podrían influenciar en la difusión del componente inhibitorio presente en la FL del fango, esta prueba fue utilizada como *screening* dado que es de fácil reproducibilidad y económica.

Por medio del ensayo cualitativo de difusión *in vitro* se observaron halos de inhibición de crecimiento de *S. aureus* y *Candida spp.* alrededor de discos impregnados con FL del fango de Copahue. El promedio de los halos de inhibición para *S. aureus* fue de $11,0 \pm 0,9$ mm. Sin embargo, resultados dispares fueron encontrados por Ma'or (23), quienes no observaron zonas de inhibición alrededor de discos impregnados con alícuotas de barros salinos del Mar Muerto frente al mismo microorganismo. La discrepancia existente entre los resultados informados en ambos estudios podría deberse a la diferente composición físico-química de la FL de los distintos ploidos/barros utilizados.

Los estudios de curva de muerte realizados frente a las distintas cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. faecalis* y *C. albicans* ensayadas muestra-

ron un importante efecto inhibitorio antes de las 4 horas y permitieron establecer el tiempo óptimo de contacto entre dichos microorganismos y la FL del fango para lograr inhibición del crecimiento bacteriano.

La FL del fango de Copahue no logró inhibir el crecimiento de las cepas de *E. coli* con ninguna de las dos técnicas ensayadas. Resultados dispares fueron obtenidos por Ma'or (23), con la técnica de difusión por discos, quienes observaron zonas de inhibición para *E. coli* alrededor de discos impregnados con barros del Mar Muerto. Por el contrario, estudios realizados en Rusia demostraron la reducción de la hidrofobicidad de las células bacterianas, la alteración de algunas propiedades biológicas (responsables para la supervivencia) y disminución de la viabilidad de cepas *E. coli* al ser incubados en un barro terapéutico salino, mientras que *S. aureus* resultó ser menos susceptible a la acción de dicho barro [24].

De los resultados obtenidos en esta investigación se desprende que:

1. La falta de difusión del fango obedecería a posibles factores como composición del medio de cultivo y cantidad del inóculo bacteriano, entre otros.

2. Por medio del ensayo cualitativo de difusión *in vitro* se observaron halos de inhibición de crecimiento con *S. aureus* y *C. albicans* (recuperados de la microbiota autóctona del hombre) alrededor de discos impregnados con FL del fango.

3. El ensayo cualitativo de difusión *in vitro* no demostró actividad inhibitoria frente a todas cepas de bacilos Gram negativos ensayadas, provenientes de pacientes de la comunidad y hospitalarios.

4. La FL produjo acción inhibitoria sobre cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. faecalis* y *C. albicans* ensayadas con la técnica de *Killing curve*.

5. El estudio dinámico de la actividad sobre *S. aureus*, *E. faecalis* y *C. albicans* demostró una acción inhibitoria antes de las 6 horas de exposición, observándose un recrecimiento con la incubación prolongada hasta las 24 horas, hecho que sugiere el agotamiento del componente inhibitorio en el medio debido a que, cuando se repicaron las colonias del recrecimiento, se observó idéntica sensibilidad a la FL, descartando la existencia de colonias resistentes.

6. Los estudios de *Killing curves* permitieron establecer el tiempo óptimo de contacto entre los microorganismos ensayados con la FL para lograr inhibición de crecimiento bacteriano.

7. Con la discordancia encontrada entre la prueba de difusión por discos y la cinética bactericida frente a *E. faecalis* y *S. epidermidis* quedó demostrada la escasa sensibilidad de las técnicas cualitativas por difusión para establecer la sensibilidad o resistencia de los diferentes microorganismos ensayados frente a la FL del fango.

8. En el estudio comparativo de curva de muerte realizado frente a distintas cepas de *S. aureus* se comprobó un importante efecto inhibitorio antes de las 4 horas, corroborando lo enunciado anteriormente.

9. La FL no produjo acción inhibitoria a través del tiempo (*Killing curve*) sobre agentes infecciosos de la comunidad y hospitalarios estudiados.

10. Se considera necesario normatizar las pruebas de susceptibilidad antimicrobianas para futuros estudios de acción inhibitoria de peloides (fango, limo, turba, otros) y de aguas termales.

11. Estos estudios preliminares necesitan ser corroborados con ensayos clínicos controlados *in vivo*.

12. De ser superadas las diferentes fases de investigación *in vivo* de la FL, sería razonable pensar en la posibilidad del empleo conjunto y complementario de la misma a una terapia farmacológica específica, ya que muchas de las opciones de tratamiento antimicrobiano actual presentan alto costo y toxicidad.

15. La aparición de cepas con multiresistencia a los antimicrobianos justifica la investigación de nuevas propuestas terapéuticas.

Agradecimientos

Al Ente Provincial Termas de Neuquén (**EPROTEN**), Argentina.

A la Universidad Nacional de Entre Ríos por el financiamiento de este trabajo.

Referencias bibliográficas

- LAGARTO PARRA A; BERNAL SOLOGUREN I. Utilización terapéutica de las aguas y fangos mineromedicinales. *Rev Cubana Farm.* 2002; 36(1):62-68.
- UBOGUI J, STENGEL F, KIEN M, SEVINSKY L, RODRÍGUEZ LUPO L. Thermalism in Argentina- alternative or complementary dermatologic therapy. *Arch dermatol.* 1998; 134:1411-1412.
- ROMERO SÁNCHEZ J. Características de las aguas minerales y fangos. Uso y control de la calidad de estos recursos. [Internet]. 1998. Disponible en: <http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/rehabilitacion-bal/peloides_romero.pdf> [13 de junio de 2007].
- ÁLVAREZ G. Contribución al estudio de las termas de Copahue (Neuquén) en sus aplicaciones dermatológicas. *Bol Asoc Med Argent.* 1938; (4):222.
- CONSTANT F; COLLIN J; GUILLEMIN F; BOULANGE M. Effectiveness of spa therapy in chronic low back pain: a randomized clinical trial. *J Rheumatol.* 1995; (22):1315-1320.
- DE MICHELE D; GIACOMINO M; UNTURA FILHO M; BELDERRAIN A. Efecto sistémicos de los fangos minerales. *Anales de Hidrología Médica.* 2006; (1):135-142.
- MARTÍN DÍAZ L. Utilización de arcillas, peloides, parapeloides y algas en medicina estética. [Internet] 2000. Disponible en <11 de junio de 2007>.
- RODRÍGUEZ RAMÍREZ R; CABRERA SALAZAR J; GONZÁLEZ TUERO J.; MACHADO PINEDA M; GONZÁLEZ QUIALA J. Peloidoterapia en las heridas quirúrgicas infectadas. *Medisan.* 2004;(8): 32-38.
- RODRÍGUEZ RAMÍREZ R; GONZÁLEZ TUERO J; CABRERA SALAZAR J; MACHADO PINEDA M; GONZÁLEZ QUIALA J. Efectos del Peloido en la cicatrización de heridas abdominales quirúrgicas dehiscentes. *Medisan.* 2005; 9 (3).
- UBOGUI J; FICOSECO H. Úlceras por decúbito e hidroterapia en las Termas de Copahue. *Arch. Arg. Dermatol.* 1990;40: 393-399.
- UBOGUI J; RODRÍGUEZ LUPO L; FICOSECO 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.
- UBOGUI J. Balneology for Psoriasis in Argentina. Alternative or complementary dermatologic therapy at Copahue Thermal Basin Complex. Acts of 35th Congress, International Society of Medical Hydrology & Climatology. Istanbul. 2006, 6-7 June: 77.
- MATZ H; ORION E; WOLF R. Balneotherapy in dermatology. *Dermatologic Therapy.* 2003. (16): 132-140.
- ACCORINTI J; WENZEL M. Biological essays in Argentine thermal algal. *Dominguezia.* 1995, 12:7-15.
- ACCORINTI J; SQUADRONE M; WENZEL M; PEREZ A. Valoración de las propiedades antimicrobianas del agua del Volcán Copahue (Neuquén, Argentina). *Arch. Argent. Dermat.T.* 1991; XLI, 229-237.
- SQUADRONE M. Acción del agua del Volcán Copahue (Neuquén, Argentina) sobre micobacterias. *Arch Argent Dermat. T.* 1992; XLII: 97-108.
- DE MICHELE DF; SPARO MD; GIACOMINO MI; SCHELL CM; DE LUCA M.M; GRENOVERO M.S. et al. Acción inhibitoria de la FL del fango del Volcán Copahue, Neuquén, Argentina sobre la microbiota de piel, fosas nasales, intestinal y vaginal. *Anales de Hidrología Médica.* 2007; (2):85-93.
- SHELL C; SPARO M; DE LUCA M; GRENOVERO S; DE MICHELE D; GIACOMINO M. et al. Actividad inhibitoria de la fase líquida del fango termal de Copahue (Neuquén, Argentina) sobre cepas de *Staphylococcus aureus*. *Anales de Hidrología Médica.* 2008. In press.
- BAILEY & SCOTT. *Diagnóstico Microbiológico.* 11va. Ed. Argentina: Editorial Panamericana. 2004.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. *Fifteenth informational supplement. M100-S15.* CLSI, Wayne, Pa. USA. 2005; 25 (1).

21. NATIONAL COMMITTEE FOR LABORATORY STANDARDS (NCCLS). *Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents. Document M26-A*. Wayne, Pennsylvania, USA. 1999.
22. GARCÍA RODRÍGUEZ J; CANTÓN R; SÁNCHEZ E; GÓMEZ-LUZ M; MARTÍNEZ L; RODRÍGUEZ-AVIAL C. et al. Procedimientos en Microbiología Clínica. *Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2000; Cap 12.
23. MA'OR Z; HENIS Y; ALON Y; ORLOV E; SØRENSEN K; OREN A. Antimicrobial properties of Dead Sea black mineral mud. *Int J Derm*. 2006; (45):504-511.
24. ABDRAKHMANOV AR, BRUDASTOV IA, ABDRAKHMANOV RA, ZHURLOV OS. The effect of therapeutic mud on the viability and persistence properties of bacteria. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*. 1997; Jul-Aug; (4):89-92.