

**Beca de  
Entrenamiento 2015  
Comisión de Investigaciones  
Científicas (CIC)**

**Becario:** Sierra, Fermin

**Directora:** Dra. Baldini,  
Mónica

**Título:** Búsqueda e identificación de micobacterias ambientales en aguas de los surgentes de la ciudad de Bahía Blanca y evaluación de su resistencia a los desinfectantes

## Introducción

La provisión de agua de bebida segura para la población, es un tema de interés y preocupación creciente en el mundo.

En Bahía Blanca el problema se ve incrementado por una alternancia entre épocas de sequía, grandes lluvias y floraciones algales, que ponen en riesgo la única fuente de agua de que dispone la ciudad, el Dique Paso de las Piedras. Esta situación impone la urgente búsqueda de fuentes alternativas, cuya calidad bacteriológica debe ser asegurada.

Las micobacterias atípicas, no tuberculosas o simplemente ambientales (MA) son consideradas patógenos emergentes capaces de causar un gran número de infecciones oportunistas en el hombre y en animales (Muraro-Wildner *et al.*, 2014). Estudios epidemiológicos sugieren que la principal fuente de contaminación en humanos sería el agua natural y de bebida. A pesar de esto no se han encontrado antecedentes de la situación en nuestro país, en lo que a prevalencia de MA en aguas se refiere. Por eso se considera de sumo interés comenzar a recabar información de la frecuencia de aislamiento y especies predominantes en fuentes de agua alternativas como son, para Bahía Blanca, los surgentes.

La ciudad de Bahía Blanca se asienta sobre una cuenca termal denominada de Bahía Blanca-Pedro Luro, que fue descubierta en 1912 por la Dirección Nacional de Geología y Minería. Dicho acuífero está limitado hacia el norte por la Sierra de la Ventana, al este por el río Sauce Grande, al sudoeste por los afloramientos de rocas graníticas en la provincia de la Pampa y al sur por el río Colorado (Santa Cruz y Busso, 1996). De las 30 perforaciones censadas por la Autoridad del Agua de la Provincia de Buenos Aires, solamente 20 de ellas tienen buena surgencia natural, el resto se encuentran obturadas, selladas o fuera de servicio (Paoloni, 2010). Cuando surgen problemas en el suministro de agua potable, gran parte de la población acude a ellos.

Los análisis bacteriológicos de rutina parecerían ser insuficientes para asegurar la ausencia de las MA, que si bien son de vida libre, pueden actuar como patógenos potenciales del hombre y los animales, y transmitirse por inhalación, ingestión o inoculación a partir de fuentes ambientales (Glover *et al.*, 1994). Esto se transforma en un problema que debe ser tenido en cuenta, ante el incremento en la población en general, de personas con compromiso inmunológico, producto del envejecimiento, del

aumento de la expectativa de vida, de enfermedades inmunosupresoras o de tratamientos médicos, siendo más susceptibles a infecciones oportunistas, como las de piel, linfadenitis y enfermedad pulmonar.

Las MA son ubicuas y su hábitat natural incluye ecosistemas acuáticos y terrestres. El lento crecimiento de las MA, sugeriría que son malos competidores comparados con otros microorganismos del agua. Sin embargo presentan mecanismos que les permiten crecer y persistir en sistemas de distribución de agua potable, debido a la capacidad de colonizar la interfase sólido-agua y producir biofilms. Éstos pueden transformarse en un importante sitio de proliferación y reservorio de patógenos oportunistas en ambientes oligotróficos. De esta forma los microorganismos resisten mejor los métodos de descontaminación, así como el accionar de los germicidas.

El aislamiento previo de MA en el agua de red de Bahía Blanca (Huerta *et al.*, 2009; Oriani *et al.*, 2015), planteó la inquietud de investigar la resistencia de las mismas al hipoclorito de sodio comúnmente utilizado para la potabilización de agua.

Es conocido que las micobacterias son relativamente resistentes a los desinfectantes y algunos de los mecanismos de resistencia han sido bien descritos para ciertas especies de MA (Manzoor *et al.*, 1999; Bello *et al.*, 2006) Esta propiedad es consecuencia de la inusual arquitectura de su pared celular, compuesta por un alto contenido lipídico de ácidos micólicos (Murray *et al.*, 2007; Bansal-Mutalik y Nikaido, 2014) que actúan como barrera de protección frente a agentes químicos (Falkinham III, 2009).

Durante décadas se ha puntualizado la necesidad de seleccionar desinfectantes adecuados para aplicar a los equipos biomédicos y al medioambiente hospitalario. Asimismo, se han documentado infecciones micobacterianas en pacientes, después de haber sido sometidos a procedimientos diagnósticos o terapéuticos con dispositivos desinfectados de manera inadecuada. (Bello *et al.*, 2006).

El glutaraldehído es un dialdehído saturado, usado como desinfectante de alto nivel y esterilizante químico. La actividad biocida de este compuesto es una consecuencia de la alquilación de grupos amino y sulfhidrilo de las proteínas y de átomos de nitrógeno de las bases púricas que alteran el ácido ribonucleico (RNA), ácido desoxirribonucleico (DNA) y la síntesis de proteínas (Rutala *et al.*, 1991). Estos productos son efectivos en un rango de 1.5% al 3%. El glutaraldehído se utiliza como desinfectante de alto nivel para equipo médico como endoscopios, tubos de espirómetro, dializadores, transductores, equipos de terapia respiratoria y de anestesia.

El uso de antisépticos a base de alcohol se ha extendido notablemente a nivel mundial para prevenir la transmisión de patógenos nosocomiales por las manos de los trabajadores de la salud (Kampf *et al.*, 2003). Esto ocurrió especialmente luego que la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2006) publicó sus guías para la higiene de manos. También es ampliamente usado para la desinfección de superficies en el laboratorio y por la comunidad en general.

## **1. Objetivos**

1.1: Buscar e identificar MA en aguas de surgentes de la ciudad de Bahía Blanca.

1.2: Estudiar, en experiencias *in vitro*, la resistencia de dos cepas a distintos desinfectantes. Los agentes germicidas seleccionados fueron: 1) Alcohol 70% y 96%, por su difundido uso doméstico y en el ámbito hospitalario, 2) hipoclorito de sodio ya que es el más ampliamente utilizado en el tratamiento de aguas de bebida, y 3) glutaraldehído (2%), por su uso en la esterilización de equipos hospitalarios.

## **2. Materiales y Métodos**

### **2.1 Búsqueda de MA en el surgente**

La toma de muestra se realizó sobre la perforación ubicada en el Parque de Mayo, que es la perforación más antigua, y más utilizada por los bahienses. Esta tiene una profundidad de 705 m. Las muestras se recolectaron en botellas de 1 L estériles. Las canillas se dejaron fluir durante 1 a 2 min previos a la recolección para arrastrar contaminantes externos. Las muestras se trasladaron rápidamente al laboratorio para ser analizadas antes de las 2 horas de haberlas recolectado. Se recolectaron 5 muestras de 2 litros de agua en distintas épocas del año. Cada una de las muestras se sometió a un análisis bacteriológico de rutina según el Código Alimentario Argentino (CAA) y a la búsqueda de MA por el método de Kamala y colaboradores (1994). Para esto, se filtraron 2000 ml de agua a través de una membrana estéril de 0,45 $\mu$ m de tamaño de poro (Millipore). El filtro se colocó en un recipiente con 5 ml de agua destilada estéril (ADE) y perlas de vidrio estériles de 5mm de diámetro, se colocaron en un agitador rotatorio a 37°C y 200 rpm (New Brunswick Scientific Co., Inc.) durante 1 hora. Posteriormente se procedió a la descontaminación empleando cantidades iguales de

NaOH al 1% y lauril sulfato de sodio (SDS) al 3% durante 10 min a 37°C. Transcurrido ese tiempo se transvasó el contenido a un tubo cónico, se centrifugó a 3500 rpm durante 15 min, se descartó el sobrenadante y se reemplazó el mismo volumen por ADE, de esta forma se lavó 3 veces (Kamala *et al.*, 1994).

Luego de la descontaminación se sembraron 150 µl en medio de cultivo Lowestein-Jensen (Britania) y se incubaron a 30, 37 y 42 ° C en la luz y en la oscuridad, controlando el posible desarrollo durante 60 días. Transcurrido el tiempo de incubación se seleccionaron colonias de posibles MA basadas en las descripción de la morfología realizada por Glover *et al.* (1994), para la realización de la coloración de ZN.

## **2.2 Evaluación de la resistencia a los germicidas**

### **2.2.1 Preparación de las suspensiones bacterianas:**

Se seleccionó una cepa de *Mycobacterium gordonae*, micobacteria de crecimiento lento y escotocromógena, (Runyon, 1959; Murray *et al.*, 2007) de la cual no se hallaron registros de patogenicidad para el hombre, y una cepa de *Mycobacterium chubuense*, micobacteria de crecimiento rápido, escotocromógena, muy poco descrita a nivel mundial. Ambas fueron aisladas de agua de red de la ciudad de Bahía Blanca (Oriani *et al.*, 2015). Las bacterias se hicieron crecer en medio Löwestein-Jensen durante 15 días. Las células fueron resuspendidas y diluidas en agua destilada estéril hasta obtener una concentración de  $10^8$  micobacterias/ml (0,5 escala de McFarland). Se realizaron las diluciones de  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y se sembraron en placas de Petri conteniendo medio de cultivo agar Middlebrook (MB) (Difco). Las placas se incubaron hasta 30 días a 30°C en cámara húmeda. De este modo se obtuvo el recuento inicial de microorganismos.

### **2.2.2 Acción del hipoclorito de sodio sobre *Mycobacterium gordonae* y *Mycobacterium chubuense***

Se colocaron 0,5 ml de la suspensión de bacterias (preparadas como se mencionó en 2.2.1), en presencia de 4,5 ml de las diferentes concentraciones de la solución de germicida: 0.5, 1, 2, 3, 4 y 5 ppm. En el caso particular de *M. chubuense* se incrementó la concentración a 8, 10, 12 y 14 ppm. Los tiempos de exposición fueron de 10 y 60

min. Transcurrido el tiempo previsto de contacto se neutralizó el desinfectante con Tiosulfato de Sodio (en relación 4:1), y se sembraron 10 µl de las correspondientes diluciones en placa de Petri con medio de cultivo MB, a fin de cuantificar los microorganismos sobrevivientes. Las placas se incubaron hasta 30 días a 30°C.

Previamente se realizó una experiencia a fin de evaluar la potencial toxicidad del agente neutralizante, tiosulfato de sodio, sobre el crecimiento bacteriano. Se prepararon soluciones del neutralizante de 0.5, 1, 2, 3, 4 y 5 ppm; y se pusieron en contacto con la suspensión bacteriana (preparadas como se detalló en 2.1) durante 10 y 60 min. Luego se sembraron las correspondientes diluciones al igual que lo mencionado en la técnica anterior.

### **2.2.3 Acción del alcohol etílico sobre *Mycobacterium gordonae* y *Mycobacterium chubuense***

Se utilizaron soluciones de alcohol etílico al 70% y 96%. Estas experiencias se realizaron en condiciones limpias y sucias (agregado de extracto de levadura al 0,5%). Se pusieron en contacto 4,5 ml del desinfectante, con 0,5 ml de la suspensión de bacterias, preparada como se detalló en 2.2.1. En este caso no se consideró necesaria la neutralización del alcohol por tratarse de un compuesto altamente volátil. Los tiempos de contacto fueron de 10 y 60 min. Transcurridos los mismos se sembraron 10 µl de las correspondientes diluciones en placa con MB, a fin de cuantificar los microorganismos sobrevivientes. Las placas se incubaron hasta 30 días a 30°C.

### **2.2.4 Acción del glutaraldehído sobre *Mycobacterium gordonae* y *Mycobacterium chubuense***

Se utilizó una solución de glutaraldehído al 2%, preparado según las indicaciones del fabricante (Surgibac G). Estas experiencias se realizaron en condiciones limpias y sucias (agregado de extracto de levadura al 0,5%). Se pusieron en contacto 4,5 ml del germicida, con 0,5 ml de la suspensión de bacterias, preparadas como se detalló en 2.2.1. Los tiempos de exposición fueron 10 y 60 min, transcurridos los mismos se neutralizó el glutaraldehído (Tween 80, bisulfito sódico, tiosulfato de sodio y diluyente) según lo propuesto por Álvarez Alcantara y colaboradores (2001). Posteriormente se sembraron 10 µl de las correspondientes diluciones en placa con MB,

a fin de cuantificar los microorganismos sobrevivientes. Las placas se incubaron hasta 30 días a 30°C.

En experiencias adicionales se evaluó la efectividad del neutralizante y su toxicidad. Para evaluar la efectividad, al desinfectante neutralizado se le adicionó una suspensión bacteriana conocida. Para descartar una posible toxicidad del neutralizante, se pusieron en contacto 4,5 ml del mismo con 0,5 ml de la suspensión bacteriana (preparada como se detalló en 2.2.1) durante 10 y 60 min. Transcurridos los mismos se sembraron 10 µl de las correspondientes diluciones en placa con MB. Las placas se incubaron hasta 30 días a 30°C.

En todos los casos, las experiencias se realizaron a temperatura ambiente (20 ± 2°C) transcurrido el tiempo de incubación se realizó el recuento de las colonias desarrolladas en un cuentacolonias. Los resultados se informaron como UFC.ml<sup>-1</sup>. Las experiencias se realizaron por cuadruplicado, asegurándose la reproducibilidad intraensayo.

### **3. Resultados**

#### **3.1 Calidad bacteriológica del agua del surgente**

Todas las muestras (n:5) analizadas cumplieron con las exigencias microbiológicas del CAA para agua de bebida (Capítulo XII, art.982). En ninguna de ellas se detectaron MA en los 2 litros.

#### **3.2 Acción del hipoclorito de sodio sobre *Mycobacterium gordonae* y *Mycobacterium chubuense***

Con los resultados de los recuentos obtenidos se calculó el porcentaje de reducción como:

$$\frac{R_i - R_f}{R_i} \cdot 100$$

R<sub>i</sub>: recuento inicial (UFC.ml<sup>-1</sup>)

R<sub>f</sub>: recuento final (UFC.ml<sup>-1</sup>)

En las Tablas 1 y 2 se presentan los porcentajes de reducción de los recuentos de MA en presencia de distintas concentraciones de hipoclorito de sodio. Los resultados se expresan para ambas especies, como medias aritméticas de las cuatro experiencias.

En el caso de *M. chubuense* (Tabla 2) se presenta solo el efecto de las mayores concentraciones de hipoclorito de sodio sobre el desarrollo de la MA, ya que entre 0,5 y 5 ppm no se registró ningún tipo de efecto sobre el crecimiento.

En la evaluación de la toxicidad del neutralizante, tiosulfato de sodio, se comprobó que el mismo no produjo cambios significativos en el crecimiento bacteriano. Por lo tanto se consideró que la reducción en el recuento de bacterias se debía al germicida en estudio.

Tabla 1 Acción de distintas concentraciones de hipoclorito de sodio sobre los recuentos de *M. gordonae*.

	Tiempo de contacto	0,5 ppm	1 ppm	2 ppm	3 ppm	4 ppm	5 ppm
% de reducción	10 min	-	61	82	97	99,95	99,9999
	60 min	-	72	90	99,99	99,99	100

Tabla 2 Acción de distintas concentraciones de hipoclorito de sodio sobre los recuentos de *M. chubuense*

	Tiempo de contacto	8 ppm	10 ppm	12 ppm	14 ppm
% de reducción	10 min	94,78	97,16	99,93	99,94
	60 min	99,76	99,97	99,98	99,99

### 3.3 Acción del glutaraldehído y el alcohol etílico sobre *Mycobacterium gordonae* y *Mycobacterium chubuense*

Los desinfectantes estudiados redujeron en un 100% la viabilidad de las dos MA probadas, tanto en 10 como en 60 minutos de contacto, en condiciones limpias y sucias.

En cuanto a las experiencias sobre el neutralizante utilizado para el glutaraldehído, se comprobó que era efectivo y que no tenía toxicidad alguna sobre los microorganismos.

#### 4. Conclusiones

A partir del presente estudio se puede concluir que el agua del surgente del Parque de Mayo presenta una excelente calidad bacteriológica ya que todas las muestras cumplieron con las exigencias del CAA y en ninguna se detectaron MA en 2L de muestra.

Los resultados obtenidos muestran que la concentración de 0,5 ppm de hipoclorito de sodio no produjo cambios en el recuento de *M. gordonae*, y que fue necesaria una concentración de 5 ppm para reducir el 100% de las mismas. Cabe destacar la notable tolerancia al hipoclorito evidenciada por *M. chubuense* que permaneció viable y sin modificaciones importantes hasta 5 ppm. Se evidenció una reducción del 99,99% en presencia de una concentración de hipoclorito de sodio de 14 ppm.

Se debe mencionar que el Código Alimentario Argentino en su artículo 982 - (Resolución Conjunta SPRyRS y SAGPyA N° 68/2007 y N° 196/2007) establece para agua de bebida un mínimo de cloro activo residual de 0,2 ppm. En experiencias anteriores se pudo determinar que la concentración en la red bahiense alcanzó valores entre 0,2 y 2 ppm, dependiendo de la temperatura ambiente y de la distancia a la Planta Patagonia, único sitio de cloración de la red local. Esto sugiere que los procedimientos actuales de desinfección no siempre logran un control efectivo de las MA en el sistema de suministro público, con el consiguiente riesgo para la población susceptible.

A partir de los resultados obtenidos del alcohol etílico como desinfectante, se puede concluir que tiene una gran efectividad en la eliminación de ambas MA estudiadas, aún con tiempos de contacto cortos (10 minutos) tanto al 70 como al 96%.

Si bien en el presente trabajo se demostró la efectividad del glutaraldehído sobre las dos MA, se han documentado cepas de MA resistentes a este (León *et al.*, 2002).

La acción de los desinfectantes y antisépticos sobre la supervivencia de *M. gordonae* y *M. chubuense*, claramente depende de la composición química y la concentración de uso.

Se puntualiza la necesidad de realizar una vigilancia continua de la acción de los germicidas frente a las MA circulantes en el ambiente, y que por diferentes vías podrían acceder a los materiales biomédicos. Particularmente preocupante serían aquellos termosensibles de difícil tratamiento por su complejo diseño.

La evaluación de diferentes agentes químicos frente a las MA propias de cada región, debería ser una parte esencial de las prácticas de control de infecciones, sobre todo teniendo en cuenta la variación clonal que se ha demostrado tienen estas bacterias, la cual invalidaría la extrapolación de resultados.

## 5. Referencias

**Álvarez Alcántara A., Espigares Rodríguez E., Gálvez Vargas R.** 2001. Valoración de desinfectantes. Método de dilución-neutralización. *Higiene y Sanidad Ambiental*, 1: 1-5.

**Anonymous:** WHO guidelines on hand hygiene in health care (advanced draft *Geneva, WHO; 2006.*

**Bansal-Mutalik, R., Nikaido, H.** 2014. Mycobacterial outer membrane is a lipid bilayer and the inner membrane is unusually rich in diacyl phosphatidylinositol dimannosides. *PNAS*. 111:13.

**Bello T., Rivera-Olivero I.A., de Waard J.H.** 2006. Inactivación de micobacterias con desinfectantes registrados como tuberculicidas. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 24:319-322.

**Código Alimentario Argentino** [Online] [http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/CAPITULO\\_XII.pdf](http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/CAPITULO_XII.pdf), visitado 08/09/2016

**Falkinham J. O.** 2009. The biology of environmental mycobacteria. *Environ. Microbiol. Reports*. 1: 477-487.

**Glover N., Holtzman A., Aronson T., Froman S., Berlin O. G., Dominguez P., Kunkel K. A., Overturf G., Stelma G. N., Smith C., Yakrus M.** 1994. The isolation and identification of *Mycobacterium avium* complex (MAC) recovered from Los Angeles potable water, a possible source of infection in AIDS patients. *Int. J. Environ. Health Res.* 4:63-72.

**Huerta Y., Oriani A., Baldini M.** 2009. *Aislamiento e identificación de micobacterias ambientales en agua de red. Estudio preliminar.* *Revista de Enfermedades Infecciosas Emergentes (REIE)* 4:13-15.

**Kamala T., Paramasivan C. N., Herbert D., Venkatesan P., Prabhakar R.** 1994. Evaluation of Procedures for Isolation of Nontuberculous Mycobacteria from Soil and Water. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:1021-1024.

**Kampf G., Meyer B., Goroncy-Bermes P.** 2003. Comparison of two test methods for the determination of sufficient antimicrobial efficacy of three different alcohol-based hand rubs for hygienic hand disinfection. *J Hosp Infect.*55:220–225

**León C. I., Pardo Y. P., Ramírez C. X.** 2002. Acción de algunos biocidas sobre las micobacterias no tuberculosas. *Biomédica.* 22:133-140.

**Manzoor S.E., Lambert P. A., Griffiths P.A., Gill M.J., Fraise A.P.J.** 1999. Reduced glutaraldehyde susceptibility in *Mycobacterium chelonae* associated with altered cell wall polysaccharides. *Antimicrob Chemother.* 43:759-65.

**Muraro Wildner L., Bazzo M.L., Coutinho Liedkes S., Lourenço Nogueira C., Segat G., Gonçalves Senna S., Schlindwein A.D., de Oliveira J.G., Rovaris, D.B., Bonjardim C.A., Kroon E.G., Ferreira C.P.** 2014. Mycobacteria mobility shift assay: a method for the rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* and nontuberculous mycobacteria. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* p.1 6.

**Murray P.R., Rosenthal K., Pfaller M.A.** 2007. Mycobacterium. En: *Medical Microbiology*, Murray PR, Rosenthal K, Pfaller MA, editors., 7th edition. Washington DC, ASM Press, p. 297-310.

**Oriani A.S., Gentili A.R., Zúñiga A.E., Oriani D.S., Baldini M.** 2015. Composición lipídica de la pared celular de tres especies de micobacterias ambientales y su posible correlación con la formación de biofilms y movilidad por sliding. *Ciencia Veterinaria.* 17:47-59.

**Paoloni J.D., Espósito, M.E., Sequeira, M., Ferrarello, C., Rodríguez L.** El acuífero termal profundo. Capítulo 5, pp 223-240. En: *Ambiente y recursos naturales del partido de Bahía Blanca. Clima, geomorfología, suelos y aguas* Juan Darío Paoloni compilador. ISBN 978-987-1648-22-1. EdiUNS .2010.

**Runyon E.H.** 1959. Anonymus mycobacteria in pulmonary disease. *The Medical Clinics of North America.* 43:273-290.

**Rutala W.A., Clontz E.P., Weber D.J., Hoffmann K.K.** 1991. Disinfection practices for endoscopes and other semicritical items. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 12(5):282-8.

**Santa Cruz J., Busso A.S.** 1996. Disponibilidad del agua subterránea para riego complementario en las provincias de Buenos Aires, Entre Ríos, Córdoba y Santa Fé. PROSAP, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación, Argentina.

## **Producción**

A partir de los resultados obtenidos en la presente Beca se realizaron dos presentaciones a Congresos:

1. ***Resistencia al hipoclorito de sodio de Mycobacterium gordonae aisladas de aguas de bebida de la ciudad de Bahía Blanca.*** Sierra, F., Oriani, A.S., Baldini, M.D. Presentado en las II Jornadas Patagónicas de Ciencias Ambientales. III Jornadas Patagónicas de Biología. V Jornadas Estudiantiles de ciencias Biológicas. A realizarse del 23 al 25 de Septiembre de 2015 en la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Trelew, Chubut.

2- ***Evaluación de la actividad biocida del glutaraldehído y del alcohol etílico sobre Micobacterias Ambientales aisladas de agua de red de la ciudad de Bahía Blanca.*** Sierra, F., Oriani, A.S., Baldini, M.D. Presentado al XXIII Congreso Latinoamericano de Microbiología y XIV Congreso Argentino de Microbiología ALAM-CAM 2016, IV Congreso Latinoamericano de Microbiología de Medicamentos y Cosméticos – CLAMME y la Reunión de la Sociedad Latinoamericana de Tuberculosis y Otras Micobacteriosis (SLAMTB), Rosario, Santa Fe, Argentina, 26 al 30 de septiembre de 2016.