



REVISTA ARGENTINA DE MICROBIOLOGÍA

www.elsevier.es/ram



ORIGINAL

Diversidad de especies de micobacterias no tuberculosas aisladas en ambientes acuáticos de la ciudad de General Pico, La Pampa, Argentina

Claudia A. Tortone^{a,*}, Delia S. Oriani^a, Ana S. Staskevich^a, Alejandra S. Oriani^b,
Lilia M. Gino^c, María J. Marfil^d, Alejandro Nava Vargas^e, Andrea K. Gioffré^d
y Martín J. Zumárraga^d

^a Cátedra de Bacteriología y Micología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Pampa, General Pico, La Pampa, Argentina

^b Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia-Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Provincia de Buenos Aires, Argentina

^c Cátedra de Parasitología y Enfermedades Parasitarias, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Pampa, General Pico, La Pampa, Argentina

^d Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (CICVyA/INTA), Hurlingham, Buenos Aires, Argentina

^e Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México

Recibido el 7 de octubre de 2017; aceptado el 6 de agosto de 2018

PALABRAS CLAVE

Micobacterias no
tuberculosas;
Biodiversidad;
Hábitats acuáticos

Resumen Las micobacterias no tuberculosas (MNT) no solo se estudian por su importancia como patógenos oportunistas, sino también por sus aplicaciones en biotecnología y biorremediación. Nuestro objetivo fue determinar la presencia de micobacterias en los distintos hábitats acuáticos de la ciudad de General Pico (provincia de La Pampa), así como su diversidad. Los porcentajes de muestras positivas a micobacterias fueron los siguientes: 37,5% en el sistema de distribución de agua de red, 32,6% en el acuífero que abastece dicho sistema, 36,8% en el agua proveniente de las precipitaciones, 53,1% en los humedales del área de influencia, 80% en los natatorios cubiertos y 33,3% en las fuentes decorativas ubicadas en plazas públicas. De los 90 aislamientos de MNT obtenidos el 8,9% no logró ser identificado a nivel de especie con los métodos utilizados, que incluyeron pruebas fenotípicas y métodos moleculares. Las especies más frecuentemente aisladas fueron *Mycobacterium fortuitum* y *Mycobacterium gordonae*. Algunas especies identificadas han sido reportadas en casos de micobacteriosis en nuestro país, entre ellas *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. vaccae*, *M. lentiflavum* y *M. nonchromogenicum*. No se aislaron MNT en muestras de agua de red con concentraciones de cloro activo residual mayores de 0,8 mg/l, mientras que en los natatorios la presencia de hasta 1,5 mg/l de cloro activo residual no fue una limitante para la proliferación de estos microorganismos.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: ctortone@yahoo.com.ar (C.A. Tortone).

<https://doi.org/10.1016/j.ram.2018.08.005>

0325-7541/© 2018 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Cómo citar este artículo: Tortone CA, et al. Diversidad de especies de micobacterias no tuberculosas aisladas en ambientes acuáticos de la ciudad de General Pico, La Pampa, Argentina. Rev Argent Microbiol. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2018.08.005>

Se puede considerar que la incidencia de micobacterias en los ambientes acuáticos de General Pico es cercana al 35%, y que la presencia de estos microorganismos y su diversidad se ve afectada por el contacto con el hombre y sus actividades, como así también por la existencia de vida animal.

© 2018 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

KEYWORDS

Non-tuberculous
mycobacteria;
Biodiversity;
Aquatic environments

Species diversity of non-tuberculous mycobacteria isolated from aquatic environments of General Pico city, Province of La Pampa (Argentina)

Abstract Non-tuberculous mycobacteria (NTM) are studied not only for their importance as emerging opportunistic pathogens but also for their applications in biotechnology and bioremediation. Our aim was to determine the occurrence and diversity of mycobacteria in different aquatic habitats of General Pico city, Province of La Pampa. The percentage of samples with positive cultures for mycobacteria were the following: 37.5% recovered from the water supply distribution system; 32.6% from the aquifer that supplies water to the distribution system; 36.8% from rain water; 53.1% from the two wetlands in the area of influence; 80% from indoor swimming pools; and 33.3% from water fountains in downtown public squares. Of the 90 NTM isolates, 8.9% could not be identified at the species level with any of the used methods, phenotypic tests and molecular methods. *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium gordonae* were the most frequently isolated species. Some of the identified species such as, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. vaccae*, *M. lentiflavum* and *M. nonchromogenicum*, have been reported in cases of mycobacteriosis in Argentina. Mycobacteria with values higher than 0.8 mg/ml of residual active chlorine were not recovered from the drinking water supply network, whereas in the swimming pools the presence of up to 1.5 mg/l was not a constraint. Based on our results, the presence of mycobacteria in aquatic environments is close to 35% and their occurrence and diversity is affected both by contact with man and his activities as well as by the existence of animal life.

© 2018 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introducción

En los últimos años se ha observado un incremento en el número de micobacteriosis o infecciones por micobacterias no tuberculosas (MNT), tanto en individuos inmunodeprimidos (por enfermedades crónicas, VIH, uso de medicamentos inmunosupresores) como en inmunocompetentes, a menudo asociadas en estos últimos a la mayor longevidad de la población, la exposición a tratamientos cosmetológicos (mesoterapia) y la aplicación de tatuajes, así como al tabaquismo y al alcoholismo^{9,19,20}. No existe evidencia de transmisión directa entre individuos y, en general, las infecciones se producen por inoculación o inhalación. Se reconoce la ubicuidad de las MNT, estas se han recuperado de diversos hábitats naturales¹⁵.

En trabajos anteriores hemos detectado MNT en suelos de los órdenes molisol²³ y oxisol²⁴ en la República Argentina. En cuanto a los ecosistemas acuáticos es poco lo que se conoce sobre la diversidad bacteriana total, a excepción de aquellos parámetros microbiológicos comúnmente estudiados¹. Aunque las MNT presentan amplia diversidad respecto a las necesidades de nutrientes y temperatura, el prolongado tiempo de generación habitualmente es el factor que impide su recuperación a partir de muestras de agua

por los métodos bacteriológicos tradicionales. Estos métodos no incluyen un proceso de descontaminación que elimine o reduzca la microbiota de rápido crecimiento^{18,21}.

La capacidad de formar *biofilm* no está restringida a ningún grupo de bacterias, y las micobacterias, debido a su compleja pared celular con alto contenido de ácidos micólicos y glucopeptidolípidos son consideradas pioneras en la formación de *biofilms*¹⁰; esta característica es sumamente importante en la persistencia de las MNT, tanto en hábitats naturales como artificiales. En la naturaleza se reconoce que la formación de *biofilm* actúa a modo de matriz impidiendo el acceso de patógenos al acuífero, mientras que en los sistemas de agua de red esta capacidad favorece su perdurabilidad en aquellos, así como el incremento de la resistencia a agentes desinfectantes⁵.

Es importante conocer la prevalencia y diversidad de las MNT en el agua, ya que algunas son consideradas patógenas oportunistas, mientras que otras son responsables del reciclado de compuestos orgánicos e inorgánicos por su intervención en los ciclos biogeoquímicos. Algunas especies son capaces de metabolizar un amplio espectro de contaminantes, tales como hidrocarburos, herbicidas u otros compuestos xenobióticos²⁸. El conocimiento de las especies micobacterianas presentes en los diferentes ecosistemas

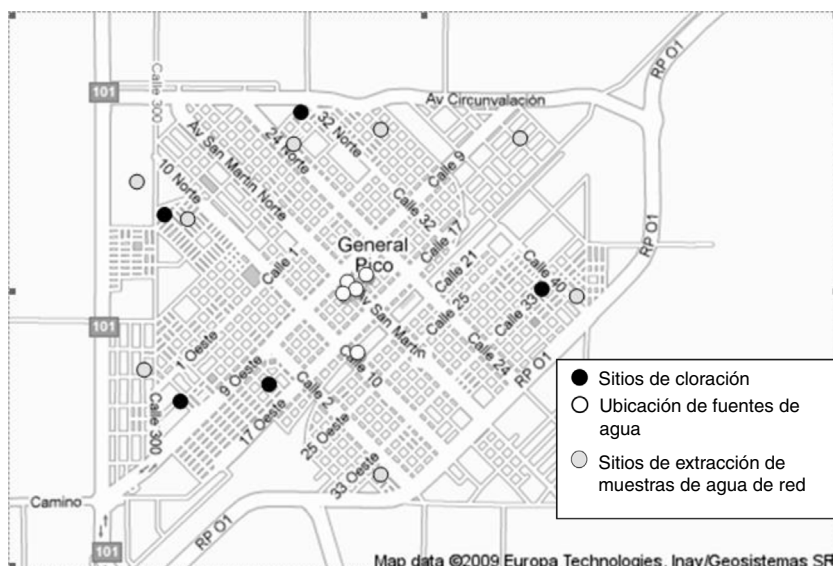


Figura 1 Mapa de la ciudad de General Pico con los sitios de muestreo.

podría dar paso a futuras investigaciones en el área de la biotecnología, como así también a estudios relacionados con su participación en infecciones en pacientes inmunocomprometidos e inmunocompetentes. Además, es importante conocer la diversidad de MNT en los ambientes naturales compartidos por el ser humano y los animales, con la finalidad de estudiar la posible interferencia de los últimos en el diagnóstico de la tuberculosis.

El objetivo de este trabajo fue determinar la presencia de micobacterias en los distintos hábitats acuáticos de la ciudad de General Pico (La Pampa, Argentina) y conocer su diversidad. Se estudió la prevalencia de MNT en la red de distribución de agua potable, como así también en el acuífero Dorila-General Pico, que abastece a dicho sistema. La presencia de bacterias en el acuífero puede obedecer a su migración desde el suelo o a que aquellas bacterias suspendidas en la atmósfera pueden ser introducidas en el acuífero por el arrastre de las precipitaciones, ya que el acuífero se recarga naturalmente por lixiviación e infiltración del agua de lluvia.

Materiales y métodos

Recolección y procesamiento de las muestras

Se establecieron 6 hábitats acuáticos en la ciudad de General Pico: 1) sistema de distribución de agua de red; 2) acuífero que suministra el agua al sistema de red; 3) agua proveniente de las precipitaciones (de las que, en parte, se nutre el acuífero); 4) 2 humedales del área de influencia de la ciudad; 5) natatorios cubiertos; y 6) fuentes decorativas ubicadas en plazas públicas.

Se analizaron un total de 136 muestras de agua, de las cuales 32 correspondieron a agua de red. El muestreo se efectuó de acuerdo con el criterio establecido por bromatología de la Municipalidad de General Pico y la Cooperativa de Electricidad y Agua Potable (CORPICO). Se seleccionaron 8 sitios de la ciudad, dependiendo de la cercanía al

lugar de cloración del agua y a la densidad poblacional; se tomaron 4 muestras durante las estaciones climáticas extremas, verano e invierno, en el período comprendido entre el invierno de 2010 y el verano de 2012 (fig. 1). En las inmediaciones del ejido de la ciudad se ubican 2 humedales, laguna de reciclados urbanos (RRU) y laguna La Arocena (LA), que cumple funciones como centro recreativo. Con la utilización de muestreadores estériles se recolectaron un total de 32 muestras de los humedales, estas se ubicaron al azar en 4 sitios de cada humedal, con 2 repeticiones anuales, también durante el mismo período de 2 años consecutivos. Se recolectaron, además, 12 muestras de agua de aquellas fuentes decorativas ubicadas en distintos espacios públicos muy concurridos por los habitantes de la ciudad (fig. 1) y 10 muestras provenientes de los 3 natatorios cubiertos. Asimismo, se recolectaron 19 muestras de agua de lluvia en 3 sitios del centro de la ciudad, de un total de 47 episodios de precipitaciones producidas en el transcurso del año 2013. Durante ese año las precipitaciones oscilaron entre 1 mm y 45 mm, según los datos oficiales de la Policía de la Provincia de La Pampa (<http://www.policia.lapampa.gov.ar/contenidos/ver/lluvias>).

El acuífero Dorila-General Pico se localiza en el Noreste de la provincia de La Pampa, sobre una faja de unos 10 km de ancho de rumbo Nor-noroeste a Sur-sureste. La ciudad de General Pico se abastece de agua mediante el funcionamiento de 110 pozos, cuya operatividad depende de las condiciones del acuífero y de la demanda de la población. Al momento del muestreo existían 58 pozos operativos, de los cuales se muestrearon aleatoriamente 16 durante 2 años consecutivos. Debido a la baja de uno de los pozos, el total de muestras recolectadas fue de 31.

Por cada muestra tomada se procesaron 500 ml, los que se descontaminaron según los protocolos ya establecidos, teniendo en cuenta la microbiota acompañante. Para aquellas muestras de agua de aspecto límpido se utilizó el método de Engel recomendado por Kamala et al.¹⁴, mientras que para las de aspecto turbio se utilizó el método de Fujimura Leite et al.¹¹. Cada muestra de agua

de red y de natatorio se recolectó en un recipiente en el volumen suficiente como para dar una concentración final de tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) de 18 mg/l, a fin de neutralizar hasta 5 mg/l de cloro residual y no interferir en el aislamiento bacteriano. Luego de la descontaminación, las muestras se sembraron por duplicado en los medios de Löwenstein Jensen, Stonebrink y Herrold con micobactina, preparados artesanalmente¹³, y se incubaron a 25 °C, 32 °C y 42 °C hasta 60 días.

Identificación de los aislamientos

Las colonias ácido alcohol resistentes identificadas como micobacterias fueron inicialmente clasificadas en grupos según Runyon²⁴, sobre la base de rasgos fenotípicos, y fueron sometidas a una identificación molecular utilizando la secuenciación parcial del gen 16S ARNr¹⁷; a las cepas no identificadas se les realizó secuenciación del gen *hsp65* o un PCR-*restriction analysis*^{12,30,31}. Las pruebas bioquímicas y fenotípicas aplicadas incluyeron la evaluación de la producción de pigmentos y la velocidad de crecimiento, la determinación de las temperaturas de desarrollo (25 °C, 32 °C, 37 °C y 42 °C), el crecimiento en presencia de hidroxilamina y de NaCl al 5%, catalasa semicuantitativa, catalasa a 68 °C, reducción de nitratos a nitritos, ureasa, pirazinamidasasa (a 4 días), arilsulfatasa (3 días y 2 semanas), β -galactosidasa, hidrólisis de Tween 80 (a 5 días y 10 días), captación de hierro, reducción de telurito (en 7 días y 9 días) y utilización de manitol y citrato^{3,13}.

Parámetros físico-químicos y microbiológicos de calidad

Mediante métodos tradicionales¹ se determinaron distintos parámetros físico-químicos y microbiológicos de calidad en las muestras extraídas, y estos variaron según el origen de aquellas. En las muestras de agua de red se determinó cloro libre residual, coliformes totales, coliformes termotolerantes y mesófilos totales. En las muestras de humedales se determinó temperatura, demanda bioquímica de oxígeno, demanda química de oxígeno, pH, conductividad y recuento total de mesófilos. Estas variables fueron estudiadas en relación con la frecuencia de aislamientos micobacterianos.

Análisis estadístico

Los datos se muestran a través de estadísticos descriptivos simples. A fin de cumplir con el objetivo propuesto se analizó la distribución y la incidencia de MNT en cada ubicación. Solo se empleó algún método estadístico adicional frente al hallazgo de variables aparentemente relacionadas. Se usó la prueba «t» de Student para la comparación de 2 medias a un nivel de significación del 95%, con el fin de establecer la relación entre la presencia de MNT y la concentración de cloro libre residual o la temperatura ambiental.

Resultados y discusión

Se identificaron MNT en el 36,8% (7/19) y en el 53,1% (17/32) de las muestras de agua de lluvia y humedales, respectivamente. En el acuífero, el 32,6% (10/31) de las muestras fueron positivas a micobacterias. En el sistema de distribución de agua de red se pudieron recuperar MNT en el 37,5% (12/32) de las muestras. El 80% (8/10) de las muestras obtenidas de natatorios tuvieron MNT; también el 33,3% (4/12) de las tomadas de las fuentes decorativas emplazadas en espacios públicos.

En las muestras de agua de red las concentraciones de cloro libre residual variaron entre 0,08 y 1,2 mg/l, y en los natatorios muestreados osciló entre 0,15 y 1,5 mg/l. No se aislaron MNT en muestras de agua de red con valores de cloro libre residual mayores de 0,8 mg/l. En el agua de red se demostró una relación significativa entre la recuperación de MNT y la concentración de cloro libre residual ($p=0,00004$), mientras que en los natatorios la presencia de hasta 1,5 mg/l de cloro libre residual no fue una limitante para el desarrollo de estos agentes, lo que demuestra su resistencia a los desinfectantes, en concordancia con lo descrito por otros investigadores^{6,7}.

El valor mínimo que especifica el Código Alimentario Argentino es de 0,2 mg/l de cloro activo residual; nuestros hallazgos evidencian que esa concentración no es adecuada para la erradicación de las MNT del agua de red. Por otro lado, no se detectaron coliformes totales, lo que indica el correcto tratamiento de desinfección del agua.

Los sistemas de distribución de agua potable ejercen una presión de selección sobre la microbiota; en tal sentido pueden resultar favorecidas las micobacterias por su capacidad para formar *biofilm* y su resistencia natural a los niveles de cloro y ozono empleados en la higienización del agua⁸. Se ha demostrado que las micobacterias pueden resistir concentraciones de cloro libre de 0,3 mg/l durante 60 min^{70,8}, y para una efectiva desinfección de *Mycobacterium avium* y *Mycobacterium intracellulare* se requieren exposiciones superiores a 1 mg/l durante más de 2 horas²⁹.

En los natatorios muestreados se aislaron micobacterias en presencia de concentraciones de hasta 1,5 mg/l de cloro activo libre; las especies aisladas a dicha concentración fueron *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium goodii* y *Mycobacterium gordonae*. Otros investigadores recuperaron MNT de muestras de agua potable con niveles de cloro libre de hasta 2,5 mg/l y niveles de cloro total de 2,8 mg/l⁷.

La temperatura ambiental fue el factor limitante para la proliferación de MNT en los humedales, y este factor también incidió en la diversidad de MNT. En las muestras recogidas durante el invierno de 2010, en el que las temperaturas registradas en el muestreo oscilaron entre 1 y 6 °C, no se recuperaron micobacterias, mientras que sí se aislaron en las muestras del invierno siguiente, con registros térmicos de 12 a 16 °C. La relación entre la presencia de MNT y la temperatura ambiental fue significativa según la prueba «t» de Student ($p=0,008$). Si bien este estudio solo comprendió 2 años consecutivos de muestreo, se pudo observar que si la temperatura ambiente de la estación invernal no es extrema, la diversidad micobacteriana va aumentando a través del tiempo, es decir, el número de especies aisladas se eleva gradualmente (fig. 2).

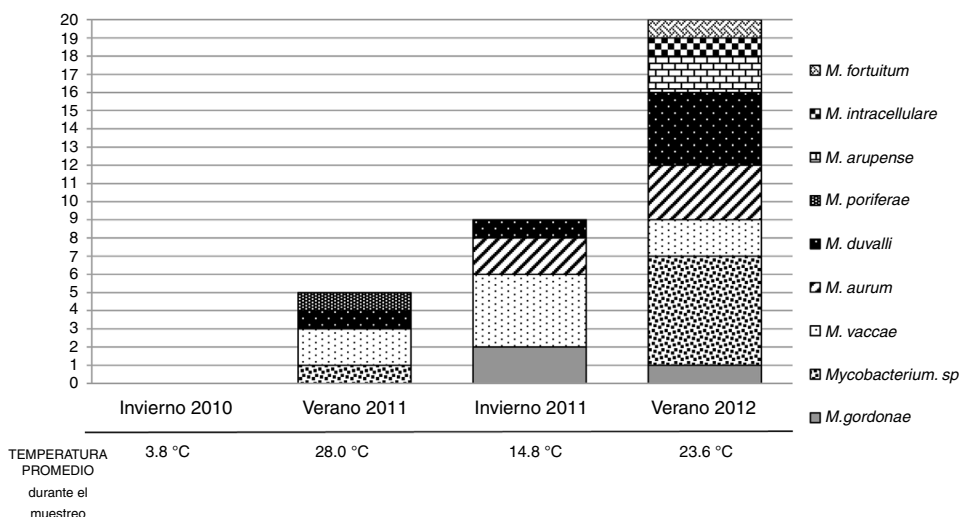


Figura 2 Frecuencia de aislamientos de micobacterias no tuberculosas en humedales, en las estaciones extremas, durante 2 años consecutivos y en relación con la temperatura ambiental.

Tabla 1 Especies de micobacterias no tuberculosas (MNT) recuperadas de hábitats acuáticos de la ciudad de General Pico, La Pampa

Especies	Origen de las muestras de agua						Total
	Red n (%)	Humedales n (%)	Fuentes n (%)	Lluvia n (%)	Pozos n (%)	Natatorios n (%)	
<i>M. gordonae</i>	2 (18,2)	3 (8,8)	1 (9,1)	-	2 (20,0)	6 (35,3)	14
<i>M. fortuitum</i>	2 (18,2)	1 (2,9)	1 (9,1)	1 (14,3)	1 (10,0)	4 (23,5)	10
<i>M. peregrinum</i>	-	-	2 (18,2)	-	3 (30,0)	-	5
<i>M. vaccae</i>	-	8 (23,5)	-	-	-	-	8
<i>M. aurum</i>	-	5 (15,0)	1 (9,1)	-	-	-	6
<i>M. arupense</i>	-	2 (5,9)	2 (18,2)	-	-	-	4
<i>M. porcinum</i>	1 (9,1)	-	-	-	-	-	1
<i>M. duvalli</i>	-	6 (17,6)	-	-	-	-	6
<i>M. asiaticum</i>	-	-	1 (9,1)	-	-	-	1
<i>M. poriferae</i>	-	1 (2,9)	-	-	-	-	1
<i>M. parafortuitum</i>	-	-	1 (9,1)	-	-	-	1
<i>M. intracellulare</i>	-	1 (2,9)	-	-	-	-	1
<i>Mycobacterium sp.</i>	-	7 (20,6)	-	1 (14,2)	-	-	8
<i>M. chubuense</i>	-	-	2 (18,2)	-	-	-	2
<i>M. phocaicum/mucogenicum</i>	-	-	-	-	-	1 (5,9)	1
<i>M. septicum</i>	-	-	-	-	2 (20,0)	-	2
<i>M. nonchromogenicum</i>	3 (27,3)	-	-	-	-	-	3
<i>M. moriokaense</i>	1 (9,1)	-	-	-	-	-	1
<i>M. lentiflavum</i>	1 (9,1)	-	-	-	-	-	1
<i>M. fluoranthenorans</i>	-	-	-	1 (14,2)	-	-	1
<i>M. neoaurum</i>	1 (9,0)	-	-	-	-	-	1
<i>M. flavescens</i>	-	-	-	2 (28,7)	-	-	2
<i>M. rhodesiae</i>	-	-	-	-	1 (10,0)	-	1
<i>M. arabiense</i>	-	-	-	-	1 (10,0)	-	1
<i>M. mucogenicum</i>	-	-	-	-	-	2 (11,7)	2
<i>M. goodii</i>	-	-	-	1 (14,3)	-	2 (11,8)	3
<i>M. iranica</i>	-	-	-	-	-	1 (5,9)	1
<i>M. holsaticum</i>	-	-	-	1 (14,3)	-	-	1
<i>M. houstonense</i>	-	-	-	-	-	1 (5,9)	1
Total	11	34	11	7	10	17	90

No se pudo establecer ninguna asociación entre el número o la diversidad de MNT y el resto de los parámetros físico-químicos o microbiológicos estudiados (datos no mostrados).

La identificación a nivel de especie de las MNT resulta compleja y requiere la utilización de métodos moleculares y convencionales. De acuerdo con un trabajo reciente de Monteserin et al.²⁰, el análisis combinado de las secuencias de al menos 2 regiones genómicas conservadas continúa siendo el método de elección.

En la [tabla 1](#) se muestran las distintas especies de MNT recuperadas según el origen de la muestra de agua. De un total de 58 (42,6%) muestras positivas se aislaron 90 cepas de MNT, de las cuales 8 (8,9%) no lograron ser identificadas a nivel de especie con los métodos utilizados ([tabla 2](#)).

M. gordonae y *M. fortuitum* fueron las especies más frecuentemente aisladas en los hábitats estudiados. Dichas especies también fueron las más frecuentes en un estudio realizado por Khosravi et al.¹⁶ en agua de hospitales, quienes consideran que estas especies son parte importante de la comunidad microbiana cultivable de los diferentes sistemas de distribución de agua de red y señalan su posible relación con la presencia de *M. fortuitum* en las muestras clínicas.

Por otro lado, es interesante destacar que se aislaron micobacterias en el 37,5% de las muestras de agua de red, valor similar a lo reportado por Covert et al.⁶ en los Estados

Unidos. Estos investigadores describieron que la incidencia de micobacterias en los sistemas de distribución de agua potable de origen subterráneo fue similar a la de aquellos que se abastecen de aguas superficiales: 31% y 36%, respectivamente. Además, estos investigadores recuperaron solo *M. gordonae* de los sistemas de distribución de agua de origen subterráneo.

Considerando las 2 características primordiales en la identificación de las MNT, velocidad de crecimiento y pigmentación²⁶, de un total de 90 aislamientos de MNT, el 72,2% (n=65) correspondieron a especies de rápido crecimiento y el 27,8% (n=25) a cepas de lento crecimiento; el 71,1% (n=64) de las cepas fueron pigmentadas. Asimismo, el 88,2% de las cepas recuperadas de humedales fueron cromogénicas, mientras que en el resto de los hábitats, entre el 30% y el 50% de las cepas presentaron dicha característica.

Estos resultados se condicen con lo descrito por algunos investigadores, quienes sostienen que la presencia de pigmentos (como los carotenoides) en las bacterias desempeña un papel muy importante en aquellos hábitats sometidos a la luz, debido a que estos compuestos protegen a las células de la fotooxidación intermediada por la luz visible y el ultravioleta cercano³³. Este tipo de pigmento le confiere color a las colonias, que puede ir desde el amarillo al rojo; esta coloración es característica de un gran número de especies del género *Mycobacterium*.

Tabla 2 Identificación de micobacterias no tuberculosas por PRA y secuenciación del gen *hsp65* (casos discrepantes)

Origen de la muestra de agua	N	Secuenciación 16S ARNr (% identidad)	Pruebas bioquímicas	PRA	Secuenciación <i>hsp65</i> (% identidad)
Red	1	<i>M. fluoranthenvivorans</i> (99)	<i>M. neoaurum</i>	<i>M. neoaurum</i> type 1	<i>M. neoaurum</i> (96)
	1	<i>M. lentiflavum</i> (99)	<i>Mycobacterium</i> sp.	<i>M. lentiflavum</i> type 1	<i>M. lentiflavum</i> (99)
	1	Spq	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i> type 9	<i>M. gordonae</i> (100)
	1	<i>M. moriokaense</i> (100)	<i>Mycobacterium</i> sp.	<i>M. brumae</i> type 1	<i>M. moriokaense</i> (97)
Fuentes	2	<i>M. austroafricanum</i> (99)	<i>M. chubuense</i> / <i>M. chlorophenolicum</i>	<i>M. parascrofulaceum</i> type 3	<i>M. rutilum</i> / <i>M. chubuense</i> / <i>M. novocastense</i> (96)
	4	<i>M. farcinogenes</i> / <i>M. senegalense</i> / <i>M. mucogenicum</i> (98)	<i>Mycobacterium</i> sp.	<i>M. komassense</i> type 1/ <i>M. parafortuitum</i> type 1	<i>Mycobacterium</i> sp. (98)
RRU	1	Spq	<i>M. poriferae</i>	<i>M. poriferae</i> type 1	<i>M. poriferae</i> (95)
	4	<i>M. duvalii</i> (99)	<i>Mycobacterium</i> sp.	<i>M. parafortuitum</i> type 1/ <i>M. komossense</i> type 1	<i>M. komossense</i> / <i>M. vaccae</i> / <i>M. novocastense</i> (96)
Lluvia	1	Spq	<i>M. aurum</i>	<i>M. vaccae</i> type 1	Spq
	2	<i>M. vaccae</i> / <i>M. flavescens</i> / <i>M. duvalii</i> / <i>M. acapulcensis</i> (98)	<i>Mycobacterium</i> sp.	<i>M. simiae</i> type 2	<i>M. austroafricanum</i> (96)
	1	<i>M. duvalii</i> (100)	<i>Mycobacterium</i> sp.	<i>M. gilvum</i> type 1	<i>M. duvalii</i> (99)
	1	<i>M. intracellulare</i> / <i>M. colombiense</i> (99)	<i>Mycobacterium</i> sp.	<i>M. lentiflavum</i> type 1/ <i>M. florentinum</i> type 1	<i>M. lentiflavum</i> (97)
1	Spq	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i> type 4	<i>M. gordonae</i> (96)	
1	<i>Mycobacterium</i> sp. (99)	<i>Mycobacterium</i> sp.	ND	ND	

ND: no determinado; Spq: secuencia de mala calidad; AR: Laguna La Arocena; RRU: Laguna de reciclados urbanos; PRA: PCR-restriction analysis.

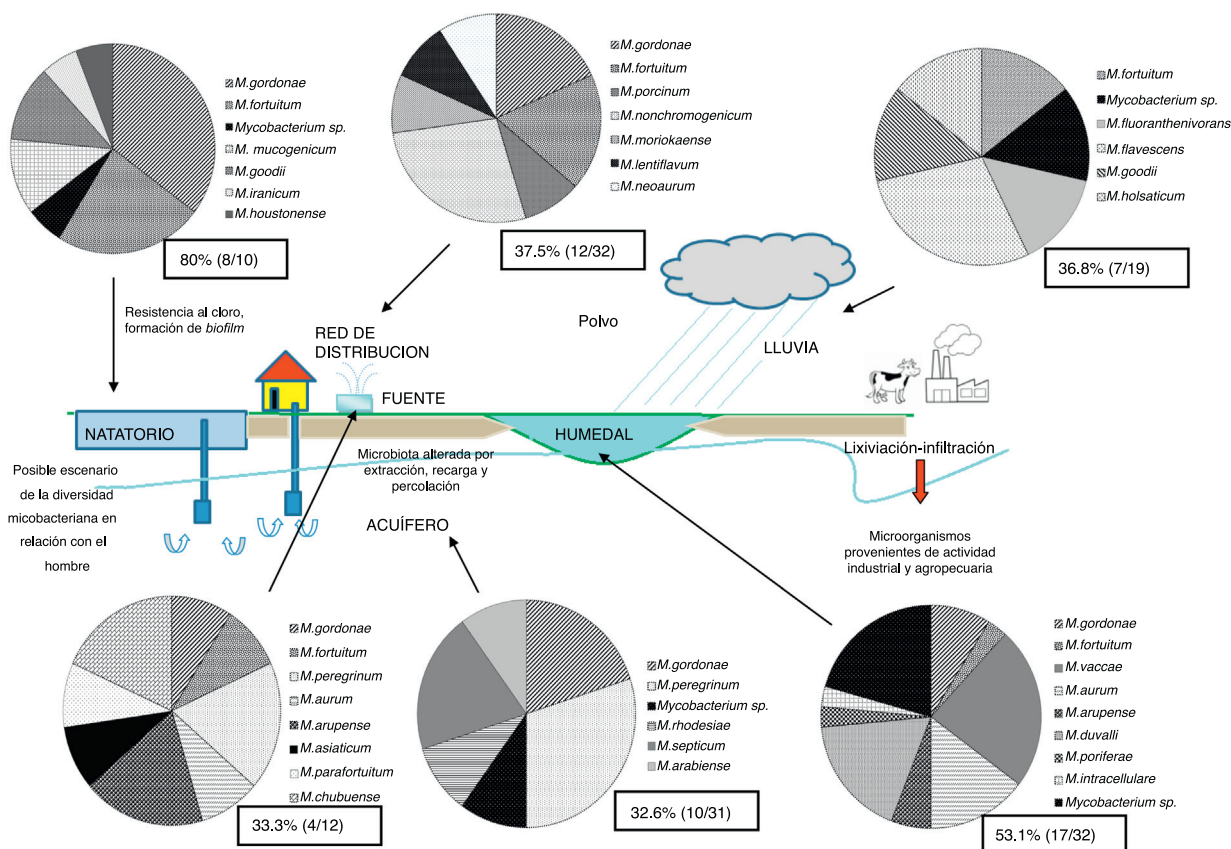


Figura 3 Ocurrencia y distribución de especies de micobacterias no tuberculosas en relación con el ciclo del agua y con las actividades desarrolladas por el ser humano. Se muestran los porcentajes de muestras positivas de cada muestreo.

En la **figura 3** se esquematizan los resultados de esta investigación en relación con el ciclo del agua y las actividades desarrolladas por el ser humano.

La diversidad de micobacterias en los ecosistemas acuáticos aquí estudiados fue similar a la descrita en la bibliografía^{15,22}. Algunas de las especies identificadas han sido reportadas en casos de micobacteriosis en nuestro país, tal es el caso de *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *Mycobacterium vaccae*, *Mycobacterium lentiflavum* y *Mycobacterium nonchromogenicum*^{2,12,20}. Cabe señalar que no todas las MNT que se aíslan ofrecen un riesgo potencial para la salud humana y animal; muchas de ellas intervienen en procesos de biorremediación⁵ degradando compuestos tóxicos e impermeabilizando el suelo, evitando así la contaminación del acuífero por químicos. Entre las especies identificadas *M. vaccae*, *Mycobacterium poriferae* y *Mycobacterium fluoranthenorans* se han descrito como biorremediadoras de suelos contaminados^{4,32}.

La mayoría de las micobacterias son especies de vida libre en el suelo y el agua, y se reconoce que el ser humano y los animales (tanto los terrestres como los acuáticos y las aves) son sus hospedadores comunes³². El mayor porcentaje de muestras positivas se encontró en los natatorios y los humedales. Con excepción de *M. goodii*, las demás especies aisladas de los natatorios —*Mycobacterium mucogenicum*, *Mycobacterium houstonense* y *Mycobacterium iranicum*— no se recuperaron del resto de los hábitats acuáticos estudiados. Dichas especies se han asociado a

infecciones tanto en pacientes inmunodeprimidos como en inmunocompetentes^{25,27,32}. Por otro lado, *M. vaccae*, *Mycobacterium duvalli* y *Mycobacterium aurum* fueron las especies más frecuentemente aisladas en humedales, aunque son consideradas no patógenas.

De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo se puede asumir que la incidencia de micobacterias en los ambientes acuáticos de General Pico es cercana al 35%, y que la presencia de estos agentes y su diversidad se ve afectada tanto por el contacto con el hombre y sus actividades como por la presencia de vida animal. En este trabajo algunas especies solo se recuperaron en determinados hábitats, mientras que otras compartieron varios de ellos, lo que puede obedecer al comportamiento del agua a través de los ecosistemas y en relación con la actividad humana.

Financiación

Este trabajo fue financiado por la Secretaría de Investigación y Posgrado de la UNLPam (Nro. Resol. 453/12) e INTA (PNSA1115056). AGK y MJZ son investigadores de CONICET.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Agradecemos a la Bqca. Mariana Gagino, responsable del laboratorio de CORPICO, su colaboración en la toma de muestras de agua de pozos de la ciudad.

Bibliografía

1. American Public Health Association, AWWA, WEF. Standard methods for examination of water and wastewater. 22nd ed. Washington: American Public Health Association; 2012.
2. Barnes AI, Rojo S, Moretto H. Prevalencia de micobacteriosis y de tuberculosis en pacientes de un hospital de referencia de la provincia de Córdoba. *Rev Argent Microbiol.* 2004;36:170-3.
3. Bernardelli A. Clasificación fenotípica de micobacterias. Manual de Procedimientos. SENASA. Ciudad Autónoma de Bs. As. Argentina. 2007.
4. Burbach B, Perry J, Rudd L. Effect of environmental pollutants and their metabolites on a soil *Mycobacterium*. *Appl Environ Biotechnol.* 1994;41:134-6.
5. Cardoso CL, de Souza Fonseca L, Da Silveira Pinto A, Bonfim ME, Angluster J, Pinto Gontijo Filho P. Degradación de petróleo e hidrocarbonetos por micobacterias. *Rev Latinoam Microbiol.* 1982;24:115-20.
6. Covert TC, Rodgers MR, Reyes AL, Stelma GN Jr. Occurrence of non-tuberculosis-like mycobacteria in environmental samples. *Appl Environ Microbiol.* 1999;65:2492-6.
7. Dailoux M, Laurain C, Weber M, Hartemann PH. Water and non-tuberculous mycobacteria. *Water Res.* 1999;33:2219-28.
8. Falkinham JO III, Norton CD, LeChevallier MW. Factors influencing numbers of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and other mycobacteria in drinking water distribution systems. *Appl Environ Microbiol.* 2001;67:1225-31.
9. Fica A, Soto A, Dabanch J, Porte L, Castro M, Thompson L, Balcells ME. Micobacterias atípicas en cinco pacientes adultos sin evidencias de inmunosupresión. Construyendo una experiencia. *Rev Chilena Infectol.* 2015;32:80-7.
10. Freeman R, Geier H, Weigel KM, Do J, Ford TE, Cangelosi GA. Roles for cell wall glycopeptidolipid in surface adherence and planktonic dispersal of *Mycobacterium avium*. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72:7554-8.
11. Fujimura Leite C, Ferracini R, Falcao P, David H, LévyPrébault V. Prevalência e distribuição de micobactérias nas águas de algumas regiões do estado de São Paulo-Brasil. *Rev Microbiol.* 1989;20:432-41.
12. Imperiale B, Zumarraga MJ, Gioffré A, Di Giulio B, Cataldi A, Morcillo N. Disease caused by non-tuberculous mycobacteria: Diagnostic procedures and treatment evaluation in the North of Buenos Aires Province. *Rev Arg Microbiol.* 2012;44:3-9.
13. Jorge MC, Alito A, Bernardelli A, Canal AM, Cataldi A, Cicuta ME, Gentile F, Kistermann JC, Magnano G, Martínez Vivot ME, Oriani DS, Paolicchi FA, Pérez AM, Romano MI, Schneider M, Torres P, Zumárraga MJ. Manual de diagnóstico de micobacterias de importancia en medicina veterinaria. Comisión científica de micobacterias AAVLD. Santa Fe Argentina. 2005:1-132.
14. Kamala T, Paramasivan CN, Herbert D, Venkatesan P, Prabhakar R. Evaluation of procedures for isolation of nontuberculous mycobacteria from soil and water. *Appl Environ Microbiol.* 1994;60:1021-4.
15. Kazda J, Pavlik I, Falkinham JO III, Hruska K. The ecology of *Mycobacteria*: Impact on animals and human health. 1st ed Dordrecht Heidelberg London, New York: Springer; 2009. p. 7-11.
16. Khosravi AD, Hashemi Shahraki A, Hashemzadeh M, Sheini Mehrabzadeh R, Teimoori A. Prevalence of non-tuberculous mycobacteria in hospital waters of major cities of Khuzestan province, Iran. *Front Cell Infect Microbiol.* 2016; 6:42.
17. Kirschner P, Böttger EC. Mycobacteria protocols methods in molecular biology. En: Parish T, Stocker NG, editores. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc. 1998;101. pp.349-361.
18. Livanainen E, Martikainen PJ, Katila ML. Comparison of some decontamination methods and growth media for isolation of Mycobacteria from northern brook waters. *J Appl Microbiol.* 1997;82:121-7.
19. Maroñas Jiménez L, Postigo Llorente MC. Micobacteriosis cutáneas: un reto diagnóstico. *Más Dermatol.* 2013;19:5-13.
20. Monteserin J, Paul R, Lopez B, Cnockaert M, Tortoli E, Menendez C, García MJ, Palomino JC, Vandamme P, Ritacco V, Martin A. Combined approach to the identification of clinically infrequent non-tuberculous mycobacteria in Argentina. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2016;20:1257-62.
21. Neumann M, Schulze-Robbecke R, Hagenau C, Behringer K. Comparison of methods for isolation of mycobacteria from water. *Appl Environ Microbiol.* 1997;63:547-52.
22. Oliveira TES, Holanda MV, Macedo MLB, Marques LEC, Sabadía JAB. Identificação de micobactérias atípicas em amostras de água ambientais em município do estado do Ceará. XXI ALAM. 2012. Resumen O17-S. Santos, Brasil.
23. Oriani DS, Sagardoy MA. Nontuberculous mycobacteria in soils of La Pampa province (Argentina). *Rev Arg Microbiol.* 2002;34:132-7.
24. Oriani DS, Tortone CA, Oriani MS. Micobacterias ambientales en oxisoles (suelos lateríticos de la Provincia de Misiones). XIV Jornada Argentina de Microbiología y III Jornada de Infectología y Microbiología NEA-MINEA. 2011. Resumen MAMB17. Resistencia, Chaco.
25. Reddy YNV, Reddy YNV, Balasubramaniam L, Mathew M, Abraham G. *Mycobacterium mucogenicum* peritonitis in a continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Patient Perit Dial Int.* 2012;32:226-7.
26. Runyon EH. Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. *Medl Clin North Am.* 1959;43:273-90.
27. Shojaei H, Daley C, Gitti Z, Hashemi A, Heidarieh P, Moore ER, Naser AD, Russo C, van Ingen J, Tortoli E. *Mycobacterium iranicum* sp. nov., a rapidly growing scotochromogenic species isolated from clinical specimens on three different continents. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2013;63:1383-9.
28. Silva RA, Grossi V, Alvarez HM. Biodegradation of phytane (2,6,10,14-tetramethylhexadecane) and accumulation of related isoprenoid wax esters by *Mycobacterium ratisbonense* strain SD4 under nitrogen-starved conditions. *FEMS Microbiol Letters.* 2007;272:220-8.
29. Taylor RM, Norton CD, Lechevallier MW, Falkinham JO III. Susceptibility of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and *Mycobacterium scrofulaceum* to chlorine, chloramine, chlorine dioxide, and ozone. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66:1702-5.
30. Telenti A, Marchesi F, Balz F, Bally E, Böttger E, Bodmer T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol.* 1993;33:175-8.
31. Tortone CA. Identificación de micobacterias ambientales, aisladas de distintas fuentes de agua, mediante análisis de patrones de restricción y su comparación con métodos fenotípicos. Tesis de Maestría en Microbiología Molecular 2014. ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán" y Universidad Nacional de San Martín.

32. Whitman WB, Goodfellow M, Kämpfer P, Busse HJ, Trujillo ME, Ludwig W, Suzuki K, editors. Bergey's manual of systematic bacteriology. 2nd ed. Vol. 5. The Actinobacteria. Part A. New York:Springer; 2012.
33. Wright LJ, Rilling HC. The function of carotenoids in a photochromogenic bacterium. *Photochem Photobiol.* 1963;2:339–42.