



UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM

FACULTAD CIENCIAS DE LA VIDA

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE MICOBACTERIAS
AMBIENTALES EN MUESTRAS DE LA PLANTA DE
TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES PALANDA-COCHA,
TENA-ECUADOR**

Proyecto de investigación previo a la obtención del título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTOR: SILVANA DEL CARMEN MOROCHO MAZA

Tutora: MGS. YEIMY MARLENE ROJAS DE HIDALGO

Napo-Ecuador
2024

DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD

Yo, Silvana del Carmen Morocho Maza, con documento de identidad N.º 1105855967, declaro que los resultados obtenidos en la investigación que presento en este documento final, previo a la obtención del título, son absolutamente inéditos, originales, auténticos y personales.

En virtud de lo cual, el contenido, criterios, opiniones, resultados, análisis, interpretaciones, conclusiones, recomendaciones y todos los demás aspectos vertidos en la presente investigación son de mi autoría y de mi absoluta responsabilidad.

Por la atención al presente, anticipo mis agradecimientos

Tena, 26 de febrero de 2024



Silvana del Carmen Morocho Maza
1105855967

AUTORIZACION DE PUBLICACION EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Yo, Silvana del Carmen Morocho Maza con documento de identidad N. ° 1105855967, en calidad de autor/a y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación: CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE MICOBACTERIAS AMBIENTALES EN MUESTRAS DE LA PLANTA DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES PALANDA-COCHA, TENA-ECUADOR de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN, reconozco a favor de la Universidad Regional Amazónica Ikiam una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Así mismo autorizo a la Universidad Regional Amazónica Ikiam para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el Repositorio Institucional de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Tena, 26 de febrero de 2024



Silvana del Carmen Morocho Maza
1105855967

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Certifico que el Trabajo de Integración Curricular Titulado: Caracterización molecular de micobacterias ambientales en muestras de la planta de tratamiento de aguas residuales Palanda-Cocha, Tena-Ecuador, en la modalidad: artículo original, fue realizado por: Silvana del Carmen Morocho Maza, bajo mi dirección.

El mismo ha sido revisado en su totalidad y analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad Regional Amazónica Ikiam, para su entrega y defensa.

Tena, 26 de febrero de 2024



Yeimy Marlene Rojas de Hidalgo, Mgs.

C.I.: 1757847783

DEDICATORIA

A mi madre y hermanos; gracias por el apoyo.

A mi prima Tishis por formar parte de toda mi vida académica.

AGRADECIMIENTOS

A Dios que por sobre todas las cosas me permitió llegar hasta el final de mi carrera.

Al Gad Municipal Tena, especialmente al Ing. Daniel Morales por permitir el muestreo en la PTAR Palandacocha.

A mis compañeras Samantha, Vanessa y Jessica.

A mi tutora Mgs. Yeimy Marlene Rojas de Hidalgo.

Al técnico Mgs. Carolina Castro por ser un guía en el desarrollo de este trabajo.

A Jefferson Pastuña, por ser mi apoyo incondicional en esta etapa final.

TABLA DE CONTENIDO

CARATULA	
DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR.....	ii
AUTORIZACION DE PUBLICACION EN EL REPOSITORIO	iii
CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN	iv
DEDICATORIA.....	v
AGRADECIMIENTOS	vi
RESUMEN.....	x
ABSTRACT.....	xi
INTRODUCCIÓN.....	1
MÉTODOS.....	4
2.1 Área de estudio, toma de muestra, procesamiento de muestra, siembra,aislamiento e identificación preliminar de cultivos	4
2.2 Extracción de ADN, PCR y secuenciación	6
2.3 Análisis bioinformático	6
RESULTADOS.....	8
DISCUSIÓN.....	13
CONCLUSIÓN.....	16
REFERENCIAS	

INDICE DE TABLA

Tabla 1: Distribución de MNT por medio de cultivo sólido.	8
Tabla 2: Diversidad alfa de los sitios de muestreo luego de la identificación mediante BLAST.	10

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de la PTAR del estudio. Tanque de homogenización (MTH), cámara anóxica (MCA) y salida (MCS).....	4
Figura 2: Ejemplo de cultivos positivos obtenidos por el método de filtración por membrana. Cultivos obtenidos en la cámara anóxica (A), tanque de homogenización (B) y cámara de salida (C).	10
Figura 3: Electroforesis de los productos PCR del gen 16s, bandas específicas que representan la amplificación de secuencias de ADN.	10
Figura 4: Representación gráfica de la proporción (%) de especies en cada sitio de muestra luego de la identificación mediante BLAST.	11
Figura 5: Ubicación filogenética de las 33 secuencias experimentales (etiquetadas con el código del primer A1F y cepa).	12

RESUMEN

Las micobacterias no tuberculosas (NMT) o micobacterias ambientales, son microorganismos capaces de resistir a desinfectantes, antibióticos y tratamientos comunes de agua potable, representando un desafío en el control de infecciones. Ante la creciente evidencia de micobacteriosis, es de interés demostrar la persistencia de NMT posterior al tratamiento de aguas residuales, para alertar respecto a posibles brotes de este tipo de enfermedades emergentes. Para ello, se seleccionó una Planta de tratamiento de aguas residuales (PTAR), en la provincia de Napo-Ecuador. En busca de especies del género *Mycobacterium*, se muestreó tres puntos estratégicos: tanque de homogeneización (MTH), cámara anóxica (MCA), y cámara de salida (MCS). Se colectó un total de 105 muestras, 35 de cada punto, las cuales se pretrataron con cloruro de hexadecilpiridinio al 1% (HPC) durante 25 minutos. Luego de la filtración, las membranas de 0,45 µm fueron sembradas en medio TSB e incubadas a 37°C. 48 cultivos (45.71%) resultaron positivos para bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR), de los cuales el 43.75% correspondieron al MTH, 35.42% al MCA y 20.83% al MCS. La extracción de ADN se realizó a 72 colonias BAAR, se seleccionaron aleatoriamente 33, a las cuales se les amplificó y secuenció el gen 16S. Se identificaron 7 especies de NMT, entre ellas *Mycobacterium magerintense*, *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium oryzae*, *Mycobacterium porcinum*, *Mycobacterium dioxanotrophicus*. En conclusión, este estudio confirma la presencia de NMT de importancia clínica en aguas residuales municipales tratadas, lo que sugiere analizar los métodos de desinfección, desarrollar estrategias de prevención y gestión efectiva de recursos hídricos.

PALABRAS CLAVE: cloruro de hexadecilpiridinio (HPC), gen 16S, micobacterias no tuberculosas (MNT), planta de tratamiento de aguas residuales (PTAR), secuenciación.

ABSTRACT

Nontuberculous mycobacteria (NTM) or environmental mycobacteria, are microorganisms capable of resisting disinfectants, antibiotics, and common treatments for drinking water, representing an infection control challenge. Given the growing evidence of mycobacteriosis, it is of interest to demonstrate the persistence of NMT after wastewater treatment, to warn possible outbreaks of this type of emerging disease. For this purpose, a wastewater treatment plant (WWTP) was selected in the province of Napo-Ecuador. In search of species of the *Mycobacterium* genus, three strategic points were sampled: homogenization tank (MTH), anoxic chamber (MCA), and outlet chamber (MCS). A total of 105 samples were collected, 35 from each point, which were pretreated with 1% hexadecylpyridinium chloride (HPC) for 25 minutes. After filtration, the 0.45 μ m membranes were seeded in TSB medium and incubated at 37 °C. 48 cultures (45.71%) were positive for acid fast bacilli alcohol resistant bacilli (AFAB), of which 43.75% corresponded to MTH, 35.42% to MCA and 20.83% to MCS. After filtration, the 0.45 μ m membranes were seeded in TSB medium and incubated at 37 °C. 48 cultures (45.71%) were positive for acid fast bacilli alcohol resistant bacilli (BAAR), of which 43.75% corresponded to MTH, 35.42% to MCA and 20.83% to MCS. DNA extraction was carried out on 72 BAAR colonies, 33 were randomly selected, from which the 16S gene was amplified and sequenced. Seven NMT species were identified, including *Mycobacterium magerintense*, *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium oryzae*, *Mycobacterium porcinum*, *Mycobacterium dioxanotrophicus*. In conclusion, this study confirms the presence of clinically important NTM in treated municipal wastewater, which suggests analyzing disinfection methods, developing prevention strategies and effective management of water resources.

KEYWORDS: hexadecylpyridinium chloride (HPC), 16S gene, nontuberculous mycobacteria (NMT), wastewater treatment plant (WWTP), sequencing.

1. INTRODUCCIÓN

La gestión y disposición adecuada de aguas residuales municipales se ha convertido en una estrategia para preservar la calidad de los cuerpos de agua locales y salvaguardar la salud de las comunidades que dependen directamente de ellos [1]. No obstante, la reutilización segura de las aguas residuales tratadas exige una evaluación adecuada de los posibles riesgos para la salud pública y el medio ambiente. La infección diseminada por micobacterias no tuberculosas (MNT) es ahora una de las enfermedades transmitidas por el agua más graves en países como los Estados Unidos (EE. UU.), donde el número estimado de muertes y el costo sanitario directo de la infección por MNT es mayor que el de otras enfermedades transmitidas por el agua [2]. Para dilucidar los aspectos epidemiológicos y la distribución de estos patógenos, muchos estudios han evaluado varios métodos y protocolos para aislar adecuadamente MNT de muestras ambientales, principalmente de agua [3].

Las MNT se refieren a especies de micobacterias distintas del complejo *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium leprae* [4]. Las MNT son microorganismos grampositivos, aerobios, ácido-alcohol resistentes, ricos en G-C, no móviles y con forma de bastón [5]. Se estima que hay más de 200 especies saprofitas, de las cuales aproximadamente 20 son patógenos humanos (p. ej. *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. xenopi*, *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*), con gran adaptabilidad y resiliencia a las presiones ambientales [6]. Esto debido a la arquitectura única de la pared celular compuesta de grandes cantidades de ácidos grasos C60-C90 (que representan aproximadamente el 40% del peso celular), peptidoglicanos, ácidos micólicos, que están unidos covalentemente al arabinogalactano, otorgando resistencia a biocidas y antibióticos [7,8]. La hidrofobicidad de los ácidos micólicos facilita la adquisición de nutrientes, la formación de biopelículas y la propagación por aerosoles [9]. Comúnmente se las puede encontrar en todos los ecosistemas, con amplio rango de temperaturas, concentraciones de oxígeno, pH y materia orgánica [10].

Las MNT son responsables de un grupo de enfermedades llamadas “micobacteriosis”, las cuales incluyen infecciones en huesos, articulaciones, pulmones, piel y tejidos blandos [11]. Los individuos más susceptibles a este tipo

de

enfermedades son aquellos cuyo sistema inmune esta debilitado, bien sea por infección con VIH/SIDA, uso de tratamiento con quimioterapia o que han recibido un trasplante de órganos [9]. Aunque el modo de transmisión de las micobacteriosis, aún no está muy claro, se reconoce que principalmente se adquieren desde fuentes ambientales [12]. Las bacterias del género *Mycobacterium* se caracterizan también por resistir a la fagocitosis lo que les permite infectar y replicarse en los tejidos del huésped [13] , con una característica clínica de formación de granulomas que contiene la interacción huésped-patógeno [14] . Al presentarse la enfermedad los síntomas comunes son: fiebre, tos y pérdida de peso. Sin embargo, la infección puede también estar inactiva, colonizar el organismo sin desarrollar síntomas y permanecer en estado de latencia [15].

Según la Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria (ARCSA), solo el 10% de las aguas residuales urbanas del Ecuador reciben algún tipo de tratamiento [16] . El tratamiento terciario que incluye cloración, ozonización y tratamiento con luz ultravioleta (UV), para la inactivación de microorganismos pueden resultar ineficaces [17]; generalmente *E.coli* es utilizado como indicador de la eficiencia del tratamiento de aguas residuales; sin embargo investigaciones han informado que varias cepas de micobacterias son entre 100 y 330 veces más resistentes al cloro [18–21]. Las PTAR que incorporan biorreactores de membrana (MBR) destacan como soluciones avanzadas de depuración, sin embargo, enfrenta desafíos críticos [22] . Una de las limitaciones operativas es el ensuciamiento de membrana (biofouling) mayoritariamente causado por carbohidratos y proteínas derivados de la biomasa generada por la lisis celular de microorganismos, la formación de biofilms de las MNT, los polisacáridos, exoenzimas promueven la adhesión de sólidos a la membrana lo que proporciona una superficie rugosa y porosa que puede servir como sustrato para el crecimiento bacteriano [23].

En publicaciones referentes a MNT, en Abiyán, Costa de marfil, África, aisló y caracterizó *Mycobacterium sp.* en aguas residuales [24] , en Abu, Dhabi, con muestras de una depuradora municipal, se identificó en las aguas tratadas mayor abundancia relativa de *M. mageritense* [25]. En España se aisló *M. llatzerense* en agua y muestras clínicas [26] , adicionalmente se ha identificado en muestras de aguas como predominantes a las especies de *M. fortuitum* y *M. chelonae* [27]. Estudio en Namwala, Zambia caracterizó *M. avium* y *M. fortuitum* en muestras

humanas y de agua [28] . Mientras que, en Latinoamérica, en México se aisló de agua potable de “buena calidad” a *M. mucogenicum*, *M. porcinum*, *M. cosmeticum*, *M. fortuitum* [29] . Argentina aisló *M. gordonae*, en sistemas de distribución de agua como: acuíferos, agua derivada de precipitaciones y humedales [30] . En Colombia, la especie más prevalente fue *M. mucogenicum* en fuentes y aguas corrientes (de casas, edificios y locales comerciales) obteniendo el 50% de muestras analizadas como positivas [31] . Un estudio del 2015 en Ecuador determinó la existencia de *M. chelonae*, *M. parafortuitum*, *M. mucogenicum* y *M. immunogenum* en diferentes pisos ecológicos, mediante pruebas bioquímicas y moleculares [32] . Actualmente, no se realiza una notificación sistemática del diagnóstico de MNT porque en varios países como Ecuador, la enfermedad no es de declaración obligatoria a las autoridades de salud pública [33] . Considerando el aumento de casos de micobacteriosis en las últimas décadas, tanto en poblaciones de alto riesgo como en la población general [34] . Esta investigación se enfocó en la caracterización de MNT en cepas aisladas de muestras de aguas residuales no tratadas y tratadas de la PTAR Palanda-cocha Tena-Ecuador. Para esto se identificó características fenotípicas de las colonias aisladas en el tanque de homogenización, cámara anóxica, cámara de salida y se determinó la diversidad de las especies presentes en las aguas residuales del Sur de la ciudad de Tena.

2. MÉTODOS

2.1 Área de estudio, toma de muestra, procesamiento de muestra, siembra, aislamiento e identificación preliminar de cultivos

Las muestras se recolectaron en la PTAR Palandacocha, ubicada en la parte sur de la ciudad de Tena, provincia del Napo, Ecuador con autorización G3566 del GAD Municipal Tena.

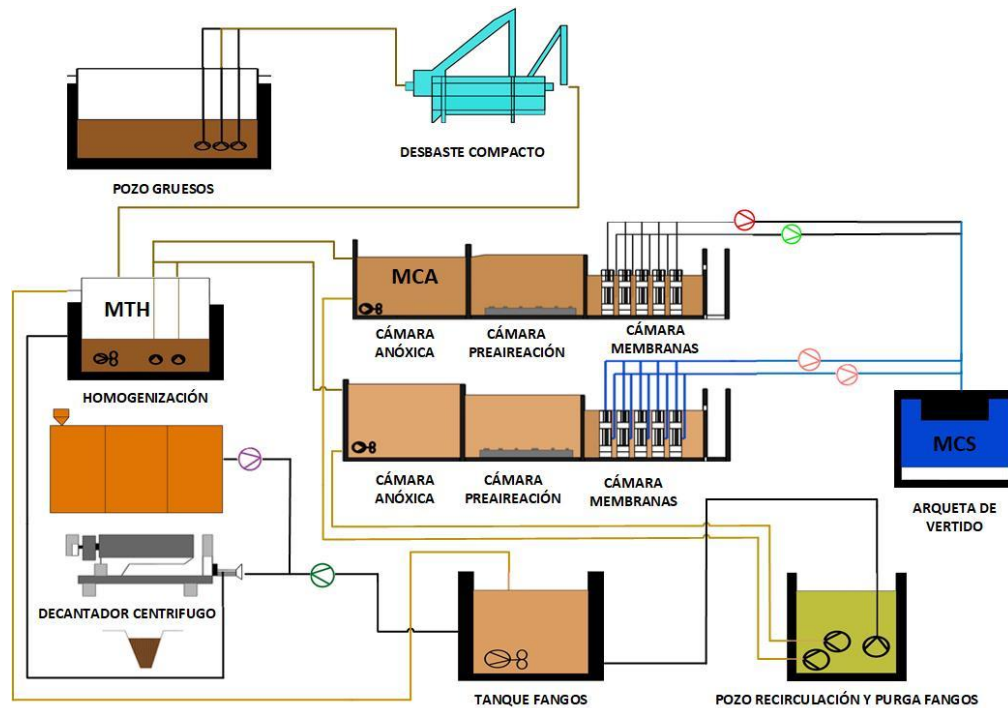


Figura 1: Esquema de la PTAR utilizada para este estudio. Tanque de homogenización (MTH), cámara anóxica (MCA) y cámara de salida (MCS).

Realizado por: Morocho, 2024.

En la actualidad el efluente de aguas residuales tratadas desemboca en el río Pano. El muestreo se realizó en cuatro meses del año 2023 (desde mayo a agosto), en tres puntos de la PTAR: cámara de salida (MCS), cámara anóxica (MCA) y tanque de homogenización (MTH) (Figura 1). Se repitió tres veces la toma de muestra en cada punto, durante tres días distintos, obteniendo un total de 105 (sin contar las réplicas) muestras de agua, cada una de volumen total 1L, las cuales se transportaron en un culler con hielo y se procesaron el mismo día. Previo al procesamiento, las muestras fueron homogeneizadas mediante agitación por

inversión y se procesaron en el siguiente orden: primero MCS, segundo MCA y tercero MTH. De manera independiente para cada punto muestreado, el procesamiento de las muestras consistió en: realizar un pool con alícuotas de 10 ml de cada triplicado, luego el pool fue mezclado e incubado por 25 minutos a 37 °C con amonio cuaternario HPC (1— Cloruro de hexadecilpiridinio) al 1% [35–37] ; posteriormente, con el sistema de filtrado al vacío esterilizado (GAST, DOA-P704-AA) se filtró el pool de muestra (30 ml) usando una membrana de 0.45 µm (MF-Millipore) [38] . Las membranas fueron sembradas sobre un medio de cultivo selectivo cuya preparación se detalla en Material Suplementario Sección 1.2S (teniendo en cuenta que la zona de la membrana expuesta al agua durante la filtración esté en contacto con el medio de cultivo) para el aislamiento de MNT según el protocolo de Radomski (2008) [39]. Tras un periodo de incubación de 48 horas a 37 °C, las membranas fueron retiradas y los medios de cultivo permanecieron en incubación durante 12 semanas revisando cada semana la presencia o ausencia de colonias [40] . Los recuentos de UFC se calcularon mediante $(\text{No. de UFC por 100 ml} = [(\text{No. de colonias en medio de cultivo}) / (\text{volumen filtrado})] \times 100)$ [41] . Una vez desarrolladas las colonias, se realizó la identificación microscópica mediante tinción Ziehl Nielsen (ZN), aquellas colonias cuyos microorganismos fueron bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR) (Material suplementario, Sección 1.6) fueron aisladas para la identificación molecular y crio preservación (70% medio y 30% glicerol) a –80 °C [42].

2.2 Extracción de ADN, PCR y secuenciación

Se aisló el ADN de las 72 cepas mediante el método de ebullición con tampón Tris-EDTA 1x [43]. Las colonias suspendidas en tapón fueron incubadas a 100 °C por 6-8 minutos, centrifugadas a 15000 rpm a 4 °C por 4-5 minutos y el sobrenadante se utilizó en la PCR [44,45]. La PCR (GoTaq® Green Master Mix de Promega®) consistió en el uso de los primer A1F (5'- CTGGCTCAGGACGAACGCTG-3') y 54R (5'-TCTAGTCTGCCCCGTATCGCCC3') para la amplificación de un fragmento del gen 16S rRNA, el termociclador (ProFlex™) se configuró con 35 ciclos como se describió en el trabajo de Hernández (1999) con ciertas modificaciones (Material suplementario, Tabla 1S, Tabla 2S) [46]. Los productos PCR se visualizaron en gel de agarosa al 1% teñido con Syber safe 1x, las muestras positivas fueron secuenciadas mediante el método Sanger con el Analizador Genético ABI 3500xL de Applied Biosystems del Departamento de Servicios de la Universidad de las Américas, Quito, Ecuador [44].

2.3 Análisis bioinformático

La limpieza de las secuencias fue realizada con lenguaje de programación R 4.2.2 (R Development) mediante el uso del paquete R sangeranalyseR (<https://github.com/roblanf/sangeranalyseR>) [47,48]. Considerando los parámetros recomendados por Crossley (2020) [49], los parámetros más importantes usados fueron, el recortado de secuencia 30 y el ruido 33 %. Luego, las secuencias tratadas en R fueron usadas para la identificación de especies mediante BLAST [50] y para la construcción del árbol filogenético, en ambos casos se usó el software Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA 11) [51]. La construcción del árbol filogenético consistió en un alineamiento múltiple usando el método neighbor-joining incorporado en el algoritmo ClustalW y los clusters se generaron con el modelo Kimura 2-parameter [52]. La construcción del árbol filogenético se realizó con las 33 secuencias experimentales tratadas en R, 22 secuencias de MNT obtenidas GenBank NCBI y *Nocardia* usada como grupo externo. Las secuencias referencia se obtuvieron mediante Blast de nucleótido (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), los parámetros de búsqueda fueron: bases de datos de ARNr/ITS (Secuencias de ARN ribosomal 16S (Bacterias y Archaea), Organismo (Mycobacteriaceae (taxid:1762), se incluyó models (xm/xp), uncultured/environmental sample sequences y no se limitó a sequence from type

material. La identidad de cada secuencia se determinó por porcentaje de cobertura, p value, porcentaje de identidad y la longitud de secuencia comparada.

Algunos de los parámetros implementados en MEGA incluyen el análisis de máxima verosimilitud (ML), el modelo Kimura 2-parameter y la robustez del bootstrapping establecida en 1000 pseudoreplicas por análisis. Finalmente, se usaron la diversidad alfa y beta para el análisis de diversidad de especies en los diferentes grupos muestrales mediante el uso del paquete R vegan (<https://github.com/vegandevs/vegan>) [53]. Todos los análisis realizados en R se encuentran en mayor detalle en el repositorio GitHub (https://github.com/IKIAM-NPLab/Environmental_Mycobacteria).

3. RESULTADOS

En general, de las 105 muestras procesadas y sembradas en medio de cultivo se obtuvieron 48 (45.71%) cultivos positivos, 8 (7.62%) negativos y 49 (46.67%) contaminados (Tabla 1). Las características tomadas en cuenta para considerar a un cultivo como positivo fueron que al menos una de su colonia sea un BAAR; los cultivos considerados como negativos fueron aquellas que transcurrido un determinado tiempo (3 meses) no se observaron Unidades Formadoras de Colonias (UFC); se usaron las diferencias fenotípicas como tiempo de crecimiento y morfología de colonias para considerar a un cultivo como contaminado, por ejemplo, los microorganismos contaminantes suelen crecer en menos tiempo que las micobacterias, así como las morfologías comúnmente observadas en MNT como se detalla en Material Suplementario, Sección 1.6, Tabla 3S, Figura 1S y 2S.

La mayor cantidad de cultivos positivos encontrados fueron en MTH con 21 (43.75 %), seguida de MCA con 17 (35.42 %) y MCS con 10 (20.83 %). En promedio, los cultivos positivos mostraron UFC de 109.90, 186.57 y 53.52 UFC/100 ml para MTH, MCA y MCS, respectivamente (Figura 2). Posteriormente, se realizaron aislamientos de los cultivos positivos, en el que, de cada uno al menos un cultivo axénico (cepas) se logró obtener. En total, se obtuvieron 72 cepas de MNT confirmadas con microscopia BAAR y características fenotípicas. Luego, se seleccionaron al azar 33 cepas para identificación molecular, previamente las características fenotípicas evaluadas de estas cepas fueron textura, pigmentación y velocidad de crecimiento [54] (Material Suplementario, Tabla 3S); se observó que 16 colonias presentaron textura superficial lisa, 13 rugosa y 4 verrugosa; 26 colonias presentaron pigmentación crema, 5 blanca y 2 naranja; considerando aquellas colonias que aparecen de entre 5-7 días como MNT de crecimiento rápido y de entre 8-18 días como MNT de crecimiento lento, el 39.99% correspondieron a MNT de crecimiento lento [55]. Al realizar un análisis entre las especies identificadas y sus características fenotípicas evaluadas se evidenció, que la especie *M. mageritense* fue encontrada tanto entre los tiempos de incubación establecidas para MNT de crecimiento rápido como de crecimiento lento; de igual manera no se encontró una textura y pigmentación única para esta especie.

Tabla 1: Distribución de MNT aisladas por medio de cultivo positivo. Donde MTH, tanque de homogeneización, MCA cámara anóxica, MCS cámara de salida.

Sitios	# de muestras procesadas	# de cultivos positivos	# de cultivos contaminados	# de cepas aisladas*	# de cepas secuenciadas
Valor absoluto (Valor en %)					
MTH	35 (33.33%)	21 (43.75%)	13 (26.53%)	24 (33.33%)	13 (39.39%)
MCA	35 (33.33%)	17 (35.42%)	16 (32.65%)	35 (48.61%)	12 (36.36%)
MCS	35 (33.33%)	10 (20.83%)	20 (40.82%)	13 (18.05%)	8 (24.24%)
TOTAL	105 (100%)	48 (100%)	49 (100%)	72 (100%)	33 (100%)

Realizado por: Morocho, Silvana, 2024.

Las bandas nítidas y específicas observadas en la electroforesis mostraron que todas las 33 cepas seleccionadas amplificaron el gen 16s rRNA (Figura 3). Luego, la comparación de secuencias del gen 16s rRNA (A1F) con las bases de datos permitió conocer las especies de las cepas antes mencionadas. De esta manera se identificaron las siguientes especies de MNT: *M. mageritense*, *M. porcinum*, *M. oryzae*, *M. syngnathidarum*, *M. fortuitum* y *M. dioxanotrophicus*. El análisis filogenético de las secuencias del gen 16s rRNA (A1F) obtenidas de las 33 cepas mostraron formación de clústeres con las secuencias de referencia de MNT usadas. A diferencia de las secuencias A1F-50Y y A1F-67Y, las ubicaciones de las secuencias experimentales junto con las secuencias de referencia de MNT coincidieron con la identificación independiente realizada con BLAST (Figura 5).

Las aguas residuales del Sur del Tena mostraron una riqueza de especies de MNT de 7. Además, se consideraron como comunidades a los tres puntos de muestro para realizar un análisis de diversidad alfa mediante los índices de diversidad Shannon y Simpson (Tabla 2). La comparación del índice Shannon entre los sitios de muestreo demostraron que la diversidad de MNT varía a lo largo de la PTAR. Las muestras de aguas analizadas antes de iniciar los procesos de tratamientos de la PTAR (MTH) mostraron valor de Shannon próximos al más inferior (0.656), en comparación con otros sitios, donde las MNT fueron más diversas (1.358). Una tendencia semejante al índice de Shannon fue encontrada en el índice de Simpson. Por otro lado, la distribución de las especies de MNT en los diferentes puntos de muestreo se muestran en la Figura 4. En general, las 7 especies identificadas tuvieron una prevalencia mayor al 7 %. Las especies *M. mageritense* y *M. abscessus* fueron identificados en los tres sitios de muestreo. Las especies *M. porcinum*, *M. oryzae* y *M. syngnathidarum* fueron encontradas únicamente en la MCA, en cambio la especie *M. dioxanotrophicus* fue observada solo en MCS.

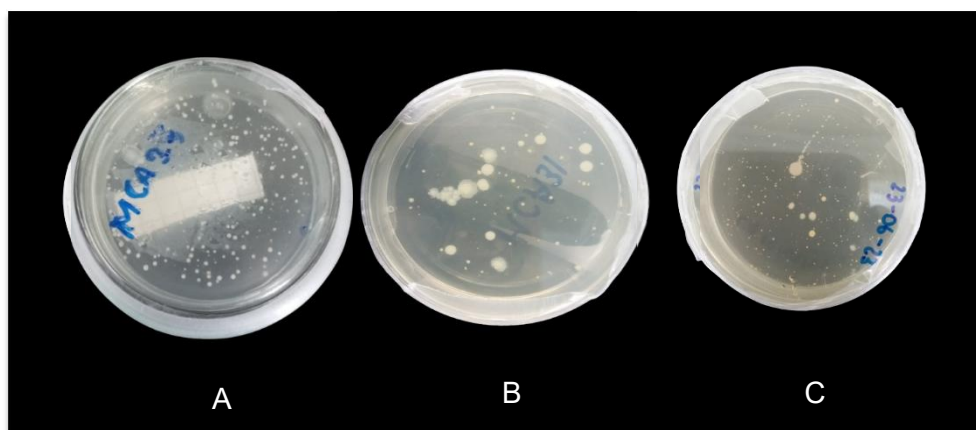


Figura 2: Cultivos positivos obtenidos por el método de filtración por membrana. Cámara anóxica (A), tanque de homogenización (B) y salida (C).
Realizado por: Morocho, 2024.

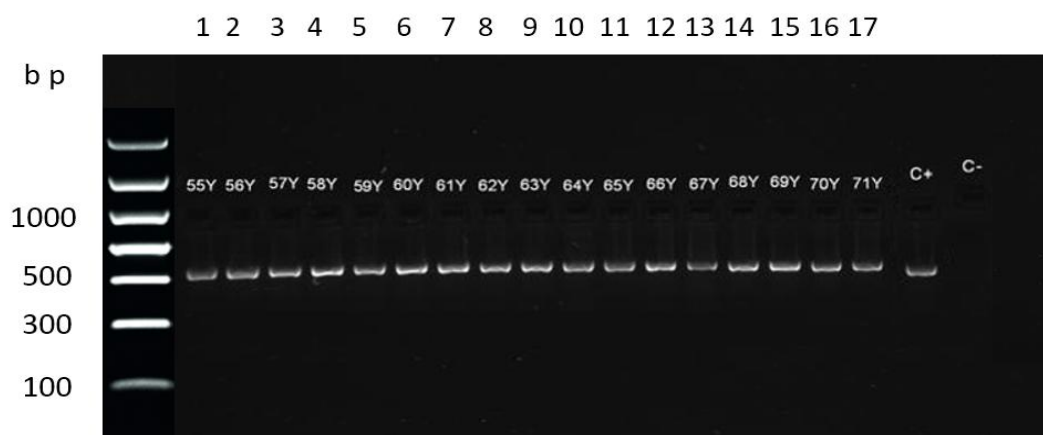


Figura 3: Electroforesis de los productos PCR del gen 16s, bandas específicas que representan la amplificación de secuencias de ADN.
Realizado por: Morocho, 2024.

Tabla 2: Diversidad alfa de los sitios de muestreo luego de la identificación mediante BLAST. Donde MTH, tanque de homogeneización, MCA cámara anóxica, MCS es salida.

Sitios	Riqueza	Simpson	Shannon
MTH	3	0.357	0.656
MCA	5	0.681	1.358
MCS	4	0.722	1.330
Total/Tena	7	-	-

Realizado por: Morocho, 2024.

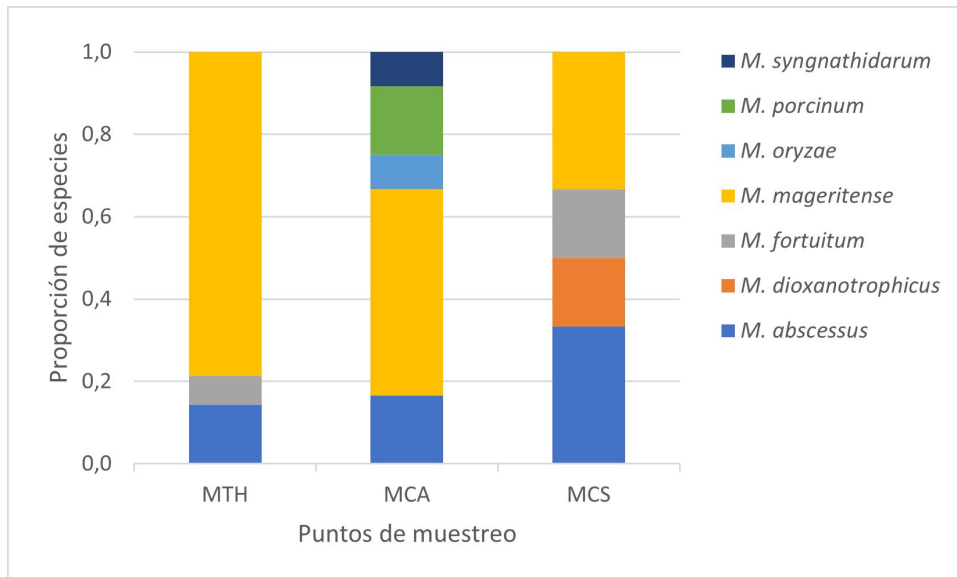


Figura 4: Representación gráfica de la proporción (%) de especies en cada sitio de muestreo luego de la identificación mediante BLAST.

Realizado por: Morocho, 2024.

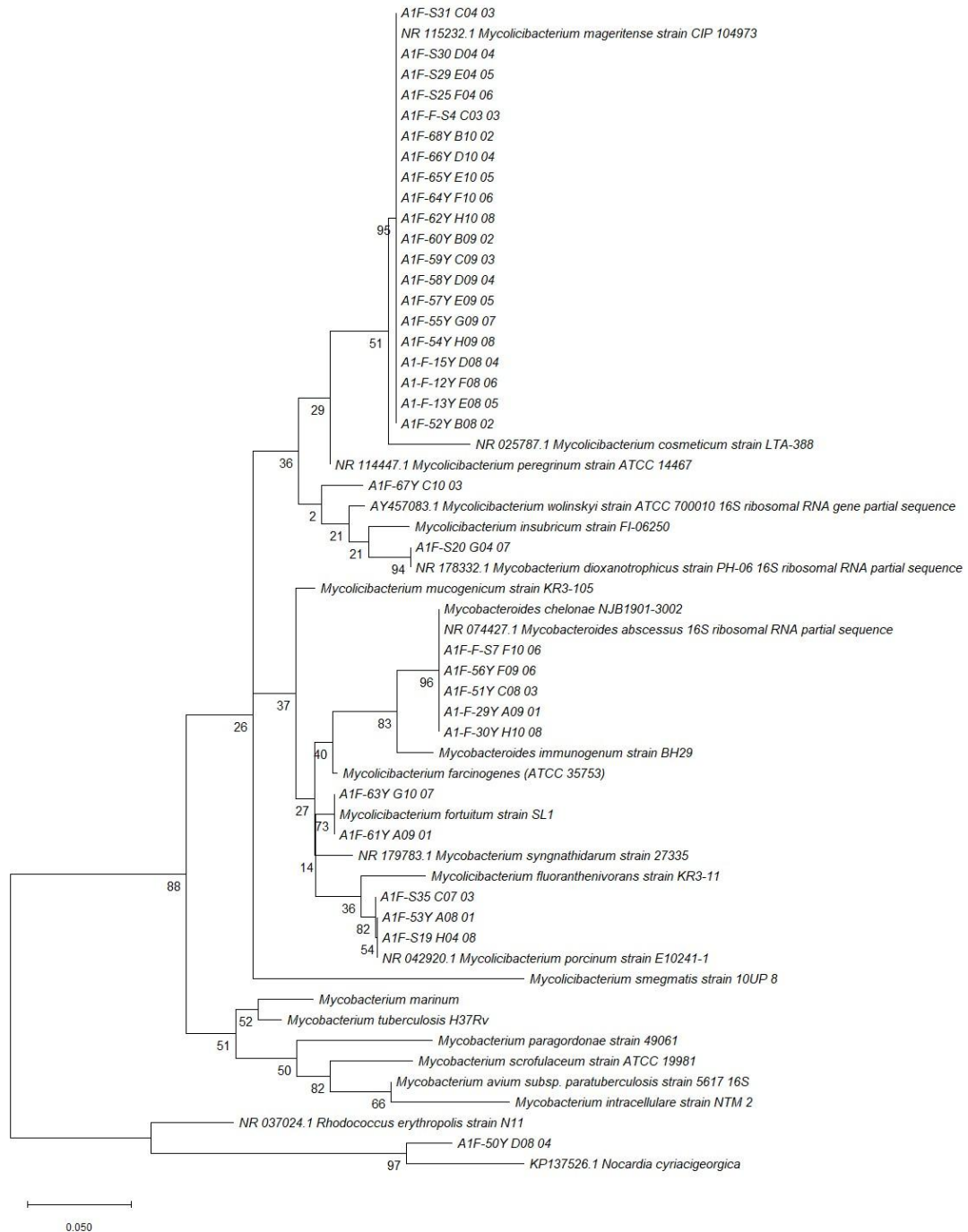


Figura 5: Ubicación filogenética de las 33 secuencias experimentales (etiquetadas con el código del primer A1F y cepa).
Realizado por: Morocho, 2024.

4. DISCUSIÓN

De manera preliminar se aislaron 72 cepas de MNT en la PTAR Palandacocha, de las cuales se escogieron al azar 33 para la identificación de especies mediante técnicas de Biología Molecular y Bioinformática. Todas las cepas seleccionadas resultaron en especies del género *Mycobacterium*: *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. mageritense*, *M. oryzae*, *M. porcinum*, *M. syngnathidarum* y *M. dioxanotrophicus*. La mayor diversidad de especies de MNT se encontraron en aguas residuales al interior (MCA) y la salida (MCS) de la PTAR que al ingreso (MTH). Los tres sitios de muestreo se caracterizaron por presentar las especies *M. abscessus* y *M. mageritense*.

De manera general en este estudio se encontraron concentraciones de MNT que van desde 53.52 a 186.57 UFC/100 ml (Figura 2). De acuerdo con la literatura científica disponible a la fecha, aún no se han determinado la dosis infecciosa específica de estos microorganismos, y lo más probable es que la virulencia difiera entre especies [56]. Sin embargo, para *M. abscessus* una especie de MNT aislada de las líneas de aguas odontológicas de Quito-Ecuador y Caracas-Venezuela [56], menos de 10 micobacterias fueron suficientes para establecer infecciones de tejidos blandos en humanos que practicaban mesoterapia y administraban inyecciones subcutáneas de 0.1 ml de solución contaminada con 100 UFC/ml de MNT [57]. Coincidentemente, esta especie de MNT fue encontrada en aguas residuales al ingreso y salida de la PTAR (Figura 4), el cual representaría un riesgo para aquellos poblados que podrían estar expuestos aguas abajo del río Pano (desemboca de la PTAR Palandacocha). Por otro lado, la presencia de *M. abscessus* en aguas tratadas se puede justificar por resistencia del mismo a desinfectantes y biocidas como los organomercuriales, el cloro y el glutaraldehído alcalino [58,59].

En cuanto a la presencia de MNT en aguas residuales, varios estudios demuestran que las bacterias patógenas u oportunistas humanas pueden sobrevivir a los procesos de tratamiento [60–62]. En este estudio se demostró la presencia de MNT en los 3 sitios de muestreo, 3 especies en MTH, 5 en MCA y 4 en MCS, resultados que fueron corroborados con la literatura [63]. Entre estos se tiene el trabajo de Cai y Zhang (2013), donde mediante análisis metagenómico reportó una baja abundancia del género *Mycobacterium* en la entrada en comparación con la salida en una PTAR [63]. El análisis alfa, Shannon y Simpson muestran que MCA alberga una mayor diversidad

tanto en términos de riqueza como de equidad en comparación a los otros dos sitios, esto se podría explicar por la ausencia de competencia por O_2 ya que se ha informado la supervivencia de *Mycobacterium* en bajos niveles de oxígeno [64], permitiendo una mayor diversidad microbiana entre los microorganismos que utilizan vías metabólicas anaeróbicas [65]. Además, otros estudios ya han observado una mayor diversidad bacteriana en aguas anóxicas frente a aguas óxicas [66].

Por otro lado, en MTH se observó una menor diversidad, cuando se pensó que en este sitio se albergarían la mayor cantidad de especies debido a que se reciben a diario volúmenes de agua con diversos patógenos humanos. Esto sugiere que este sitio no alberga las condiciones adecuadas en comparación a MCA. Sin embargo, se necesitan más estudios comparativos basados en planes de muestreo bien diseñados para determinar los principales factores de esta disimilitud. En nuestro estudio *M. mageritense* se aisló en mayor frecuencia de forma consistente en los tres sitios, coincidiendo con los resultados de Yamrot et al, realizado en Abu Dhabi, con muestras de la depuradora municipal central de lodos activados, y que emplea desinfección con cloro [25]. A pesar de que por técnicas moleculares se ha detectado la presencia de MNT un estudio realizado por Chandra y Arora [67] también informó una eliminación del 50% de la carga micobacteriana durante los procesos de tratamiento primario de aguas residuales. Estos informes indican que las plantas de tratamiento de aguas residuales pueden tener diferentes eficiencias en la eliminación de células *Mycobacterium*.

Aunque existan pocos informes que describan la distribución de MNT en América del Sur, Zweijpfenning et al (2018) reportó que las especies que se encuentran con mayor frecuencia en esta parte del mundo son las del complejo MAC, con una frecuencia del 34%, seguidas de *M. kansasii* con 17%, *M. gordonae* con 15% y *M. fortuitum* con 9% [68]. Sin embargo, en América del Sur no se han investigado las MNT en aguas residuales, lo que si se ha documentado son especies de *Mycobacterium* en muestras de agua potable y muestras clínicas [69–71]. En cuanto a la importancia clínica se reconoció a 5 especies como patógenos oportunistas de crecimiento rápido y que *M. abscessus*, *M. fortuitum* son no pigmentadas y se han asociado a casi todas las enfermedades en humanos [72]. Castellano y colegas identificaron *M. abscessus* y *M. fortuitum* en un consultorio odontológico en Quito-Ecuador [56], tras cirugías cosméticas [73], lesiones inflamatorias [74], tractos sinusales cutáneos odontogénicos [75]. En Ecuador *M. fortuitum* se identificó en una infección ósea [76] y en tractos

sinusales cutáneos odontogénicos [75] ; *M. syngnathidarum*, se ha asociado a infecciones en peces [77] , y a una infección intraabdominal en un paciente inmunocompetente [57]; *M. porcinum*, en humanos se ha relacionado con infecciones del catéter central y neumonitis [78] ; *M. mageritense* hasta la fecha, solo se ha notificado unos pocos casos de infección en tejidos blandos [79–81]. Cabe señalar que las infecciones respiratorias, especialmente las debidas a MNT de lento crecimiento, varían según la región geográfica [82–84].

5. CONCLUSIÓN

Este estudio exploratorio representa la primera aproximación a la identificación molecular de especies, caracterización fenotípica y determinación de la diversidad de micobacterias ambientales en aguas residuales del cantón Tena-Ecuador. A pesar de que no se encontró una estrategia satisfactoria para el aislamiento de micobacterias de crecimiento lento a partir de muestras polimicrobianas. Se identificaron siete especies de micobacterias no tuberculosas (MNT), *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. mageritense*, *M. oryzae*, *M. porcinum*, *M. syngnathidarum* y *M. dioxanotrophicus* en tres puntos estratégicos de la planta de tratamiento de aguas residuales (PTAR) Palandacocha. Los índices de diversidad demostraron que la cámara anóxica (MCA) y cámara de salida (MCS) albergan una gran diversidad de especies, lo que sugiere que posiblemente estos dos sitios son nichos de MNT. Por ende, se recalca la importancia de analizar los métodos de desinfección empleadas por la PTAR Palandacocha, desarrollar estrategias de prevención y gestión efectiva de las aguas residuales. Se espera que al completar la secuenciación de las 39 muestras de ADN 16S ribosomal faltantes se pueda obtener resultados más robustos, para futuras investigaciones se podría complementar los resultados mediante la amplificación del gen *hsp65* y *rpoB*.

6. REFERENCIAS

1. Amha YM, Anwar MZ, Kumaraswamy R, Henschel A, Ahmad F. Mycobacteria in Municipal Wastewater Treatment and Reuse: Microbial Diversity for Screening the Occurrence of Clinically and Environmentally Relevant Species in Arid Regions. *Environ Sci Technol.* 2017;51: 3048–3056. doi:10.1021/ACS.EST.6B05580/SUPPL_FILE/ES6B05580_SI_001.PDF
2. Collier SA, Deng L, Adam EA, Benedict KM, Beshearse EM, Blackstock AJ, et al. Estimate of Burden and Direct Healthcare Cost of Infectious Waterborne Disease in the United States - Volume 27, Number 1—January 2021 - *Emerging Infectious Diseases journal - CDC.* *Emerg Infect Dis.* 2021;27: 140–149. doi:10.3201/EID2701.190676
3. Loret JF, Dumoutier N. Non-tuberculous mycobacteria in drinking water systems: A review of prevalence data and control means. *Int J Hyg Environ Health.* 2019;222: 628–634. doi:10.1016/J.IJHEH.2019.01.002
4. Haworth CS, Banks J, Capstick T, Fisher AJ, Gorsuch T, Laurenson IF, et al. British Thoracic Society guidelines for the management of non-tuberculous mycobacterial pulmonary disease (NTM-PD) Summary of reCommendaTionS and good praCTiCe poinTS SeCTion 4: WhaT iS The evidenCe for TranSmisSion of nTm BeTWeen individualS? recommendation. *Thorax.* 2017;72: 1–64. doi:10.1136/thoraxjnl-2017-210927
5. Percival SL, Williams DW. Mycobacterium. *Microbiology of Waterborne Diseases: Microbiological Aspects and Risks: Second Edition.* 2014; 177–207. doi:10.1016/B978-0-12-415846-7.00009-3
6. Kalpana T, Mugunthan M, Joseph NM, Ellappan K. A Comprehensive Review and Update on Epidemiology, Symptomatology and Management of Nontuberculous Mycobacteria (NTM). *J Pure Appl Microbiol.* 2022;16: 814–824. doi:10.22207/JPAM.16.2.41
7. Tarashi S, Siadat SD, Fateh A. Nontuberculous Mycobacterial Resistance to Antibiotics and Disinfectants: Challenges Still Ahead. *Biomed Res Int.* 2022;2022. doi:10.1155/2022/8168750
8. Madacki J, Laval F, Grzegorzewicz A, Lemassu A, Záhorszka M, Arand M, et al. Impact of the epoxide hydrolase EphD on the metabolism of mycolic acids in mycobacteria. *Journal of Biological Chemistry.* 2018;293: 5172–5184. doi:10.1074/JBC.RA117.000246
9. Primm TP, Lucero CA, Falkinham JO. Health Impacts of Environmental Mycobacteria. *Clin Microbiol Rev.* 2004;17: 98. doi:10.1128/CMR.17.1.98-106.2004
10. Brennan PJ, Nikaido H. The envelope of mycobacteria. *Annu Rev Biochem.* 1995;64: 29–63. doi:10.1146/ANNUREV.BI.64.070195.000333
11. Sharma S, Upadhyay V. Epidemiología, diagnóstico y tratamiento de enfermedades micobacterianas no tuberculosas. *La revista india de investigación médica.* 2020 [cited 28 Jan 2024]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7881820/>
12. Cabello-Vílchez AM, Núñez-Ato RG, Cabello-Vílchez AM, Núñez-Ato RG. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE MICOBACTERIAS NO TUBERCULOSAS EN EL SISTEMA DE DISTRIBUCIÓN DE AGUA EN UN HOSPITAL DE LIMA (PERÚ). *Biosalud.* 2018;17: 7–24. doi:10.17151/BIOSA.2018.17.2.1
13. Sousa S, Borges V, Joao I, Gomes J, Microorganismos LJ-, 2019 undefined. Persistencia de micobacterias no tuberculosas en un modelo celular que imita macrófagos alveolares. *mdpi.com* Sousa, V Borges, I Joao, JP Gomes, L Jordao *Microorganismos,* 2019 • *mdpi.com.* 2019;7. doi:10.3390/microorganisms7050113
14. Mansch HCR, Smith DA, Mielke MEA, Hahn H, Bancroft GJ, Ehlers S. Mechanisms of granuloma formation in murine *Mycobacterium avium* infection: the contribution of CD4+ T cells. *Int Immunol.* 1996;8: 1299–1310. doi:10.1093/INTIMM/8.8.1299
15. Cha S Bin, Jeon BY, Kim WS, Kim JS, Kim HM, Kwon KW, et al. Experimental Reactivation of Pulmonary *Mycobacterium avium* Complex Infection in a Modified Cornell-Like Murine Model. *PLoS One.* 2015;10.

16. Secretaria Nacional de Planificación. Informe Evaluación de los servicios públicos de Agua potable y saneamiento 2015 – 2021. [cited 30 Dec 2023]. Available: https://www.inclusion.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2023/03/SNP-GSDS-informe-eval-serv-publicos-agua-potable-y-saneamiento-2015-2021_compressed.pdf
17. Bartolomeu M, Monteiro CJP, Fontes M, Neves MGPMS, Faustino MAF, Almeida A. Photodynamic inactivation of microorganisms in different water matrices: The effect of physicochemical parameters on the treatment outcome. *Science of The Total Environment*. 2023;860: 160427. doi:10.1016/J.SCITOTENV.2022.160427
18. Bouts T, Vordermeier M, Flach E, Routh A. Positive skin and serologic test results of diagnostic assays for bovine tuberculosis and subsequent isolation of *Mycobacterium interjectum* in a pygmy hippopotamus (*Hexaprotodon liberiensis*). *J Zoo Wildl Med*. 2009;40: 536–542. doi:10.1638/2008-0001.1
19. MAGEE J, Systematic... AW-BM of, 2012 undefined. Familia III. *Micobacteriaceae* Chester 1897, 63AL. books.google.com. [cited 6 Jul 2022]. Available: https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=66UMS7A2KisC&oi=fnd&pg=PA312&dq=Magee+y+War d,+2012&ots=_9LVmMpWC5&sig=1yb3kZL6YyDzapEg8rm49_zA72E
20. Falkinham JO. Nontuberculous mycobacteria in the environment. *Clin Chest Med*. 2002;23: 529–551. doi:10.1016/S0272-5231(02)00014-X
21. Wang J, Sui M, Yuan B, Li H, Lu H. Inactivation of two *Mycobacteria* by free chlorine: Effectiveness, influencing factors, and mechanisms. *Sci Total Environ*. 2019;648: 271–284. doi:10.1016/J.SCITOTENV.2018.07.451
22. Xiao K, Liang S, Wang X, Chen C, Huang X. Current state and challenges of full-scale membrane bioreactor applications: A critical review. *Bioresour Technol*. 2019;271: 473–481. doi:10.1016/J.BIORTECH.2018.09.061
23. Muñoz-Egea MC, Akir A, Esteban J. *Mycobacterium* biofilms. *Biofilm*. 2023;5: 100107. doi:10.1016/J.BIOFLM.2023.100107
24. Vakou S, Djaman J, Sabine dri, Julien C-K, Lydie Nina A, Nicolas B, et al. Article no.SAJRM.58303 Reviewers: (1) Ebissa Bayana Kebede. Article in *South Asian Journal of Research in Microbiology*. 2020;7: 34–40. doi:10.9734/sajrm/2020/v7i230167
25. Centro de ciencia | *Micobacterias en el tratamiento y reutilización de aguas residuales municipales: diversidad microbiana para detectar la aparición de especies clínica y ambientalmente relevantes en regiones áridas*. *Ciencia y tecnología ambientales*, 51(5), 3048–3056 | 10.1021/acs.est.6b05580. [cited 31 Dec 2023]. Available: <https://sci-hub.se/https://doi.org/10.1021/acs.est.6b05580>
26. David Saurina Z. *Micobacterias ambientales asociadas a sistemas de distribución de aguas potables y puras*. 2015 [cited 22 Jan 2023]. Available: <http://dspace.uib.es/xmlui/handle/11201/149117>
27. Lecuona M, Abreu R, Rodríguez-Álvarez C, Castro B, Campos S, Hernández-Porto M, et al. First isolation of *Mycobacterium canariensis* from municipal water supplies in Tenerife, Canary Islands, Spain. *Int J Hyg Environ Health*. 2016;219: 48–52. doi:10.1016/J.IJHEH.2015.08.005
28. Monde N, Munyeme M, Muwonge A, Muma JB, Malama S. Characterization of non-tuberculous mycobacterium from humans and water in an Agropastoral area in Zambia. *BMC Infect Dis*. 2018;18. doi:10.1186/S12879-017-2939-Y
29. Perez-Martinez I, Aguilar-Ayala DA, Fernandez-Rendon E, Carrillo-Sanchez AK, Helguera-Repetto AC, Rivera-Gutierrez S, et al. Occurrence of potentially pathogenic nontuberculous mycobacteria in Mexican household potable water: A pilot study. *BMC Res Notes*. 2013;6: 1–7. doi:10.1186/1756-0500-6-531/FIGURES/3
30. Oriani A, Marfil M, Zumárraga M, Baldini M. Prevalence and species diversity of nontuberculous mycobacteria in drinking water supply system of Bahía Blanca City, Argentina. *Int J Mycobacteriol*. 2019;8: 138–145. doi:10.4103/IJMY.IJMY_39_19

31. Dávalos AF, Garcia PK, Montoya-Pachongo C, Rengifo A, Guerrero D, Díaz-Ordoñez L, et al. Identification of Nontuberculous Mycobacteria in Drinking Water in Cali, Colombia. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2021, Vol 18, Page 8451. 2021;18: 8451. doi:10.3390/IJERPH18168451
32. Muşoiu Cedeño VE. Aislamiento y genotipificación de las primeras micobacterias ambientales en el centro-norte del Ecuador. 2020 [cited 30 Jan 2024]. Available: <http://localhost:8080/xmlui/handle/123456789/3692>
33. Baldwin SL, Larsen Id SE, Ordway D, Cassell G, Colerid RN. The complexities and challenges of preventing and treating nontuberculous mycobacterial diseases. 2019 [cited 10 Dec 2023]. doi:10.1371/journal.pntd.0007083
34. Dahl VN, Møhlhave M, Fløe A, van Ingen J, Schön T, Lillebaek T, et al. Global trends of pulmonary infections with nontuberculous mycobacteria: a systematic review. *International Journal of Infectious Diseases*. 2022;125: 120–131. doi:10.1016/J.IJID.2022.10.013
35. Sattar A, Zakaria Z, Abu J, Aziz SA, Gabriel RP. Evaluation of six decontamination procedures for isolation of *Mycobacterium avium* complex from avian feces. *PLoS One*. 2018;13: e0202034. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0202034
36. Radomski N, Betelli L, Moilleron R, Haenn S, Moulin L, Cambau E, et al. *Mycobacterium* behavior in wastewater treatment plant, a bacterial model distinct from *Escherichia coli* and enterococci. *Environ Sci Technol*. 2011;45: 5380–5386. doi:10.1021/ES104084C/ASSET/IMAGES/MEDIUM/ES-2010-04084C_0002.GIF
37. Corner LAL, O'Meara D, Costello E, Lesellier S, Gormley E. The distribution of *Mycobacterium bovis* infection in naturally infected badgers. *The Veterinary Journal*. 2012;194: 166–172. doi:10.1016/J.TVJL.2012.03.013
38. Examen Bacteriológico de Aguas: Protocolo de Filtración por Membrana. [cited 2 Feb 2024]. Available: <https://asm.org/protocols/bacteriological-examination-of-waters-membrane-fi>
39. Radomski N, Lucas F, Cambau E, Moulin L, Haenn S, Régis M. Programme PIREN-Seine-actions MNT 2008 Développement de méthodes de quantification des mycobactéries non tuberculeuses dans l'eau de la Seine.
40. Ditommaso S, Giacomuzzi M, Memoli G, Garlasco J, Curtioni A, Iannaccone M, et al. A New Culture Method for the Detection of Non-Tuberculous Mycobacteria in Water Samples from Heater–Cooler Units and Extracorporeal Membrane Oxygenation Machines. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2022, Vol 19, Page 10645. 2022;19: 10645. doi:10.3390/IJERPH191710645
41. Análisis Bacteriológico del Agua • Microbe Online. [cited 3 Jan 2024]. Available: <https://microbeonline.com/analysis-of-water-membrane-filtration-technique/>
42. Arteta AA, Arias LF, Cadavid CE. Coloración de Ziehl-Neelsen en el laboratorio de patología: rendimiento y contribución al diagnóstico de micobacterias en el lavado broncoalveolar. *Biomédica*. 2022;42: 460–469. doi:10.7705/BIOMEDICA.6347
43. Koentjoro MP, Donastin A, Prasetyo EN. A SIMPLE METHOD OF DNA EXTRACTION OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS FROM SPUTUM CULTURES FOR SEQUENCING ANALYSIS. *Afr J Infect Dis*. 2021;15: 19. doi:10.21010/AJIDV15I2S:2
44. Ledesma Y, Echeverría G, Claro-Almea F, ... DS. La reidentificación de aislamientos clínicos de micobacterias no tuberculosas previamente no identificables muestra una gran diversidad de especies y la presencia de otras... *Patógenos*. 2022 [cited 21 May 2023]. doi:10.3390/pathogens11101159
45. Koentjoro M, Donastin A, Infectious... EP-AJ of, 2021 undefined. Un método simple de extracción de ADN de *Mycobacterium tuberculosis* de cultivos de esputo para análisis de secuenciación. *ajol.infolniciar sesión*. 2021; 19–22. doi:10.21010/ajid
46. Hernandez SM, Morlock GP, Ray Butler W, Crawford JT, Cooksey RC. Identification of *Mycobacterium* Species by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analyses Using Fluorescence Capillary Electrophoresis. *J Clin Microbiol*. 1999. Available: <https://journals.asm.org/journal/jcm>

47. Kuanhao-Chao. sangeranalyseR. Jun 2022 [cited 1 Jan 2024]. Available: <https://github.com/roblanf/sangeranalyseR.git>
48. Chao KH, Barton K, Palmer S, Lanfear R. SangeranalyseR: Simple and Interactive Processing of Sanger Sequencing Data in R. *Genome Biol Evol.* 2021;13. doi:10.1093/GBE/EVAB028
49. Crossley BM, Bai J, Glaser A, Maes R, Porter E, Killian ML, et al. Guidelines for Sanger sequencing and molecular assay monitoring. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.* 2020;32: 767–775. doi:10.1177/1040638720905833/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177_1040638720905833-FIG1.JPEG
50. Tamura K, Stecher G, Kumar S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol Biol Evol.* 2021;38: 3022–3027. doi:10.1093/molbev/msab120
51. MEGA. [cited 1 Jan 2024]. Available: <https://www.megasoftware.net/>
52. Hall BG. Building Phylogenetic Trees from Molecular Data with MEGA. *Mol Biol Evol.* 2013;30: 1229–1235. doi:10.1093/MOLBEV/MST012
53. vegandevs/vegan: Paquete R para ecologistas comunitarios: métodos de ordenación populares, modelos ecológicos nulos y análisis de diversidad. [cited 1 Jan 2024]. Available: <https://github.com/vegandevs/vegan>
54. Centro de ciencia | Micobacteria. Manual de sistemática de arqueas y bacterias de Bergey, 1–84 | 10.1002/9781118960608.gbm00029. [cited 6 Jan 2024]. Available: <https://scihub.se/10.1002/9781118960608.gbm00029>
55. Esteban J, Navas E. Treatment of infections caused by nontuberculous mycobacteria. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (English Edition).* 2018;36: 586–592. doi:10.1016/J.EIMCE.2017.10.010
56. Castellano Realpe OJ, Gutiérrez JC, Sierra DA, Pazmiño Martínez LA, Prado Palacios YY, Echeverría G, et al. Dental Unit Waterlines in Quito and Caracas Contaminated with Nontuberculous Mycobacteria: A Potential Health Risk in Dental Practice. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2020, Vol 17, Page 2348. 2020;17: 2348. doi:10.3390/IJERPH17072348
57. Rivera-Olivero IA, Guevara A, Escalona A, Oliver M, Pérez-Alfonzo R, Piquero J, et al. [Soft-tissue infections due to non-tuberculous mycobacteria following mesotherapy. What is the price of beauty]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2006;24: 302–306. doi:10.1157/13089664
58. Centro de ciencia | Actividad de la reductasa mercúrica y evidencia de resistencia al mercurio de amplio espectro entre aislados clínicos de micobacterias de rápido crecimiento. *Agentes antimicrobianos y quimioterapia*, 35(5), 819–823 | 10.1128/AAC.35.5.819. [cited 7 Jan 2024]. Available: <https://scihub.se/10.1128/AAC.35.5.819>
59. Wallace RJ, Hull SI, Silcox VA, Steele LC, Forrester GD, Labidi A, et al. Diversity and sources of rapidly growing mycobacteria associated with infections following cardiac surgery. *J Infect Dis.* 1989;159: 708–716. doi:10.1093/INFDIS/159.4.708
60. Talan A, Tyagi RD. Fate of pathogens and viruses in hospital wastewater and their treatment methods. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Environmental and Health Impact of Hospital Wastewater.* 2020; 149–175. doi:10.1016/B978-0-12-819722-6.00005-5
61. Chahal C, van den Akker B, Young F, Franco C, Blackbeard J, Monis P. Pathogen and Particle Associations in Wastewater: Significance and Implications for Treatment and Disinfection Processes. *Adv Appl Microbiol.* 2016;97: 63–119. doi:10.1016/BS.AAMBS.2016.08.001
62. Al-Gheethi AA, Efaq AN, Bala JD, Norli I, Abdel-Monem MO, Ab. Kadir MO. Removal of pathogenic bacteria from sewage-treated effluent and biosolids for agricultural purposes. *Applied Water Science* 2018 8:2. 2018;8: 1–25. doi:10.1007/S13201-018-0698-6
63. Cai L, Zhang T. Detecting human bacterial pathogens in wastewater treatment plants by a high-throughput shotgun sequencing technique. *Environ Sci Technol.* 2013;47: 5433–5441. doi:10.1021/ES400275R/SUPPL_FILE/ES400275R_SI_001.PDF

64. Lewis AH, Falkinham JO. Microaerobic growth and anaerobic survival of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare* and *Mycobacterium scrofulaceum*. *Int J Mycobacteriol*. 2015;4: 25–30. doi:10.1016/J.IJMYCO.2014.11.066
65. Humayoun SB, Bano N, Hollibaugh JT. Depth distribution of microbial diversity in Mono Lake, a meromictic soda lake in California. *Appl Environ Microbiol*. 2003;69: 1030–1042. doi:10.1128/AEM.69.2.1030-1042.2003
66. Lehours AC, Evans P, Bardot C, Joblin K, Gérard F. Phylogenetic Diversity of Archaea and Bacteria in the Anoxic Zone of a Meromictic Lake (Lake Pavin, France). *Appl Environ Microbiol*. 2007;73: 2016. doi:10.1128/AEM.01490-06
67. Chandra K, Arora VK. Occupational Lung Diseases in Sewage Workers: A Systematic Review. *REVIEW ARTICLE JIACM*. 2018;19: 121–153.
68. Zweijpfenning SMH, Ingen J Van, Hoefsloot W. Geographic Distribution of Nontuberculous *Mycobacteria* Isolated from Clinical Specimens: A Systematic Review. *Semin Respir Crit Care Med*. 2018;39: 336–342. doi:10.1055/S-0038-1660864
69. Halstrom S, Price P, micobacteriología RT-R internacional de, 2015 undefined. *Micobacterias ambientales como causa de infección humana*. ElsevierIniciar sesión. [cited 31 Jan 2024]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2212553115000680>
70. Hoefsloot W, van Ingen J, Andrejak C, Bauriaud R, Bemer P, Beylis N, et al. La diversidad geográfica de micobacterias no tuberculosas aisladas de muestras pulmonares: un estudio colaborativo NTM-NET. *Europeo*. 2013 [cited 31 Jan 2024]. doi:10.1183/09031936.00149212
71. Stout J, Koh W, Yew W. Actualización sobre enfermedad pulmonar por micobacterias no tuberculosas. *Revista internacional de enfermedades infecciosas*. 2016 [cited 31 Jan 2024]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1201971216309936>
72. Garcia-Coca M, Rodriguez-Sevilla G, Muñoz-Egea MC, Perez-Jorge C, Carrasco-Anton N, Esteban J. Historical evolution of the diseases caused by non-pigmented rapidly growing mycobacteria in a University Hospital. *Revista Española de Quimioterapia*. 2019;32: 451. Available: [/pmc/articles/PMC6790884/](https://pmc/articles/PMC6790884/)
73. Moreno-Izquierdo C, Zurita J, Contreras-Yametti FI, Jara-Palacios MA. *Mycobacterium abscessus* subspecies *abscessus* infection associated with cosmetic surgical procedures: Cases series. *IDCases*. 2020;22: e00992. doi:10.1016/J.IDCR.2020.E00992
74. (PDF) *Mycobacterium abscessus* aislado de pacientes con lesiones inflamatorias de curso crónico. [cited 5 Jan 2024]. Available: https://www.researchgate.net/publication/318967706_Mycobacterium_abscessus_aislada_de_pacientes_con_lesiones_inflamatorias_de_curso_cronico
75. Pérez-Alfonzo R, Poleo Brito LE, Vergara MS, Ruiz Damasco A, Meneses Rodríguez PL, Kannee Quintero CE, et al. Odontogenic cutaneous sinus tracts due to infection with nontuberculous mycobacteria: a report of three cases. *BMC Infect Dis*. 2020;20. doi:10.1186/S12879-020-05015-5
76. Vista de Infección ósea por *micobacterium fortuitum* (no tuberculosa). [cited 5 Jan 2024]. Available: <http://revistacientificaseot.com/index.php/revseot/article/view/163/296>
77. Fogelson SB, Camus AC, Lorenz W, Phillips A, Bartlett P, Sanchez S. *Mycobacterium synnathidarum* sp. nov., a rapidly growing mycobacterium identified in synnathid fish. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2018;68: 3696–3700. doi:10.1099/IJSEM.0.002978
78. Brown-Elliott BA, Wallace RJ, Tichindelean C, Sarria JC, McNulty S, Vasireddy R, et al. Five-year outbreak of community- and hospital-acquired *Mycobacterium porcinum* infections related to public water supplies. *J Clin Microbiol*. 2011;49: 4231–4238. doi:10.1128/JCM.05122-11
79. Oiwa T, Murata T, Honda T, Nakano S, Kabashima K. A Case of Subcutaneous Infection with *Mycobacterium mageritense* Identified by Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization-time of Flight Mass Spectrometry. *Acta Derm Venereol*. 2018;98: 987–988. doi:10.2340/00015555-3005
80. Park A, Hathaway AM, Wright NE, Park AM, Hathaway NE, Wright KT. Infección del tatuaje por

Mycobacterium mageritense: una complicación conocida con una nueva especie. Revista en línea de dermatología. 2020;26: 11–12. doi:10.5070/D3264048349

81. Etesami I, Ghanadan A, Khorasanizadeh F, Dadkhahfar S, Kalantari Y. *Mycobacterium mageritense* subcutaneous infection following cryopreserved facial fat injection: A report of 2 cases. *JAAD Case Rep.* 2022;22: 78–81. doi:10.1016/J.JDCR.2022.02.013
82. Adjemian J, Olivier KN, Seitz AE, Falkinham Iii JO, Holland SM, Prevots DR. Grupos espaciales de enfermedades pulmonares por micobacterias no tuberculosas en los Estados Unidos. *Revista estadounidense de.* 2012;186: 553–558. doi:10.1164/rccm.201205-0913OC
83. Spaulding AB, Lai YL, Zelazny AM, Olivier KN, Kadri SS, Rebecca Prevots D, et al. Geographic distribution of nontuberculous mycobacterial species identified among clinical isolates in the United States, 2009-2013. *Ann Am Thorac Soc.* 2017;14: 1655–1661. doi:10.1513/ANNALSATS.201611-860OC/SUPPL_FILE/DISCLOSURES.PDF
84. Simons S, Ingen J van, Hsueh P-R, Hung N Van, Dekhuijzen PNR, Boeree MJ, et al. Nontuberculous *Mycobacteria* in Respiratory Tract Infections, Eastern Asia. *Emerg Infect Dis.* 2011;17: 343. doi:10.3201/EID1703100604

MATERIAL SUPLEMENTARIO

1. METODOLOGÍA

1.1 Muestreo

El muestreo se realizó tres veces en cada punto: tanque de homogeneización, cámara anóxica y salida. Durante los meses de mayo, junio, julio y agosto se tomaron 105 muestras. Introduciendo el envase estéril cerrado al punto de recolección, una vez sumergido este se abre y se llena completamente para evitar el ingreso de aire que pueda alterar la muestra hasta su análisis [1]. Las muestras fueron transportadas en un cooler con hielo, y el procesamiento se llevó a cabo el mismo día de recolección.

1.2 Preparación de medio de cultivo

Para el cultivo y aislamiento de micobacterias ambientales se siguió el protocolo establecido por Radomski et al, 2008 [2]. Se disolvió, 30 g del medio deshidratado Trypto Casein Soy Broth (TSB), 15 g de agar y 10 ml de glicerol 1% en 1000 ml de agua tipo I. Se esterilizó en autoclave por 45 min. Se agregó los antibióticos, vancomicina (10 mg/ml), ácido nalidíxico (25 mg/ml) y anfotericina B (5 mg/ml). Finalmente, los medios de cultivo se dispensaron en cajas Petri de 60 x15 mm.

1.3 Pretratamiento

Los triplicados de las muestras de la cámara de salida, anóxica y tanque de homogenización se homogenizaron por 1 min manualmente. Se tomó 15 ml de cada triplicado en un tubo falcón y se centrifugó a 4700 xg por 15 min a 4°C. Seguidamente se transvasó 30 ml del sobrenadante y se descontaminó con amonio cuaternario HPC (1- Hexadecylpyridinium Chloride), al 1% y una incubación de 20 min a 37°C [3–5].

1.4 Filtración al vacío

Tras el pretratamiento y la esterilización del sistema de filtrado con hipoclorito de sodio. Se preparo el equipo de filtración con el filtro de membrana Millipore 0,45 μm [6]. Con el equipo armado y encendido, se agregó 1 L de agua destilada para neutralizar los restos de hipoclorito. Se procedió a homogeneizar la muestra por agitación y se filtró las muestras por separado según corresponda: cámara de salida, anóxica y tanque de homogenización.

1.5 Siembra

Una vez la filtración culmino, las membranas se colocaron sobre los medios de cultivo de manera que la zona expuesta al agua durante la filtración esté en contacto con el medio de cultivo. La incubación se realizó a 37 °C por un periodo de incubación de 48 horas las membranas Millipore se retiraron y los medios de cultivo permanecieron en incubación durante 12 semanas. Tiempo establecido para el cultivo de las micobacterias de más lento crecimiento [7,8].

1.6 Identificación y clasificación de las colonias

Se observó la velocidad de crecimiento en el transcurso de los tres meses de incubación. Una vez desarrolladas las colonias, se realizó la identificación morfológica. Esto según la clasificación de Runyon, que describe el crecimiento rápido y lento junto a la pigmentación que se produce y la tinción de Ziehl Nielsen. Para la tinción se tomó con el asa bacteriológica una muestra de la colonia, y se colocó en un portaobjetos con agua destilada para diluir [37]. Luego se pasó el portaobjetos por calor para fijar la muestra, y se agregó el primer colorante carbol-fucsina se procedió nuevamente a colocar la muestra al fuego. Seguidamente, la muestra se lavó con agua destilada y se agregó ácido alcohol al 3% durante 5 minutos. Finalmente, se lavó la muestra y se añadió el colorante azul de metileno por 2 minutos, se lavó y se dejó secar para observar en el microscopio [9]. Las bacterias ácido alcohol resistentes (BAAR) se observan como bastones de color rosa intenso.

1.7 PCR

Tabla 1S. Reactivos y concentración final de PCR

Reactivos	Concentración	Volumen	Total
Buffer	1X	5 µL	25 µL
MgCl₂	2.5 mM	2.5 µL	
dNTP	200 µM	0.5 µL	
Primer Forward	0.5 µM	1.25 µL	
Primer Reverse	0.5 µM	1.25 µL	
Taq Polimerasa	1U	0.2 µL	
Agua ultrapura	-	9.3 µL	
DNA	-	5 µL	

Fuente: Hernández et al., 1999

Tabla 2S. Condiciones PCR para el gen 16S.

	Temperatura	Tiempo	
Desnaturalización inicial	95°C	5 min	
Desnaturalización	96 °C	30s	35 ciclos
Hibridación	61°C	30s	
Extensión	72°C	30s	
Extensión final	72°C	10 min	
Conservación	4°C	~	

Fuente: Hernández et al., 1999

Tabla 3S. Identificación fenotípica de 33 muestras secuenciadas. MTH (13), MCA (12), y MCS (8), donde CDna (Código de extracción de ADN), Csenger (Código de secuenciación); ID (% identidad).

Sitio	CDna	CSenger	Textura	Color	Forma	Días de crecimiento	Blast Identificación	ID	Identificación por análisis filogenético
MTH	S16	65y	rugosa	crema	redonda	7	<i>M. mageritense</i>	100	<i>M. mageritense</i>
	S5	13y	rugosa	crema	redonda	15	<i>M. mageritense</i>	100	<i>M. mageritense</i>
	S52	63Y	rugosa	crema	redonda	9	<i>M. fortuitum</i>	100	<i>M. fortuitum</i>
	S6	15y	lisa	crema	redonda	7	<i>M. mageritense</i>	100	<i>M. mageritense</i>
	S17	66y	lisa	crema	redonda	6	<i>M. mageritense</i>	100	<i>M. mageritense</i>
	S8	64y	verrugosa	crema	redonda	7	<i>M. mageritense</i>	100	<i>M. mageritense</i>
	S44	55y	verrugosa	crema	redonda	6	<i>M. mageritense</i>	100	<i>M. mageritense</i>
	S46	57Y	lisa	blanca	ovalada	7	<i>M. mageritense</i>	100	<i>M. mageritense</i>
	S4		rugosa	crema	ovalada	14	<i>M. mageritense</i>	100	<i>M. mageritense</i>
	S7		lisa	crema	ovalada	10	<i>M. abscessus</i>	100	<i>M. chelonae</i>
	S29		rugosa	crema	ovalada	6	<i>M. mageritense</i>	100	<i>M. mageritense</i>
	S30		lisa	crema	ovalada	6	<i>M. mageritense</i>	100	<i>M. mageritense</i>
	S31		rugosa	crema	ovalada	5	<i>M. mageritense</i>	100	<i>M. mageritense</i>
MCA	S2	12y	lisa	crema	redonda	8	<i>M. mageritense</i>	100	<i>M. mageritense</i>
	S48	59Y	lisa	crema	redonda	5	<i>M. mageritense</i>	100	<i>M. mageritense</i>
	S32	68y	lisa	crema	redonda	7	<i>M. mageritense</i>	99.25	<i>M. mageritense</i>
	S39	50Y	lisa	naranja	redonda	10	<i>M. syngnathidarum</i>	94.51	Sin identificar
	S45	56y	lisa	blanca	ovalada	12	<i>M. abscessus</i>	100	<i>M. abscessus</i>
	S41	52y	lisa	blanca	ovalada	6	<i>M. mageritense</i>	100	<i>M. mageritense</i>
	S43	54y	lisa	blanca	ovalada	6	<i>M. mageritense</i>	100	<i>M. mageritense</i>
	S18	67y	verrugosa	crema	redonda	7	<i>M. oryzae</i>	98.32	Sin identificar
	S42	53y	verrugosa	naranja	redonda	5	<i>M. porcinum</i>	100	<i>M. porcinum</i>
	S49	60Y	rugosa	crema	redonda	5	<i>M. mageritense</i>	100	<i>M. mageritense</i>
	S40	51Y	rugosa	crema	redonda	6	<i>M. abscessus</i>	100	<i>M. abscessus</i>
	S35		rugosa	amarilla	redonda	6	<i>M. porcinum</i>	100	<i>M. porcinum</i>
MCS	S51	62Y	lisa	crema	ovalada	6	<i>M. mageritense</i>	100	<i>M. mageritense</i>
	S9	29y	lisa	crema	ovalada	10	<i>M. abscessus</i>	100	<i>M. chelonae</i>
	S50	61Y	rugosa	crema	ovalada	7	<i>M. fortuitum</i>	100	<i>M. fortuitum</i>
	S10	30y	rugosa	crema	redonda	10	<i>M. abscessus</i>	100	<i>M. abscessus</i>
	S47	58y	rugosa	blanca	redonda	6	<i>M. mageritense</i>	100	<i>M. mageritense</i>
	S19		rugosa	crema	redonda	10	<i>M. porcinum</i>	100	<i>M. porcinum</i>
	S20		lisa	crema	redonda	10	<i>M. dioxanotrophicus</i>	100	<i>M. dioxanotrophicus</i>
	S25		lisa	crema	ovalada	18	<i>M. mageritense</i>	100	<i>M. mageritense</i>

Realizado por: Morocho, 2024.

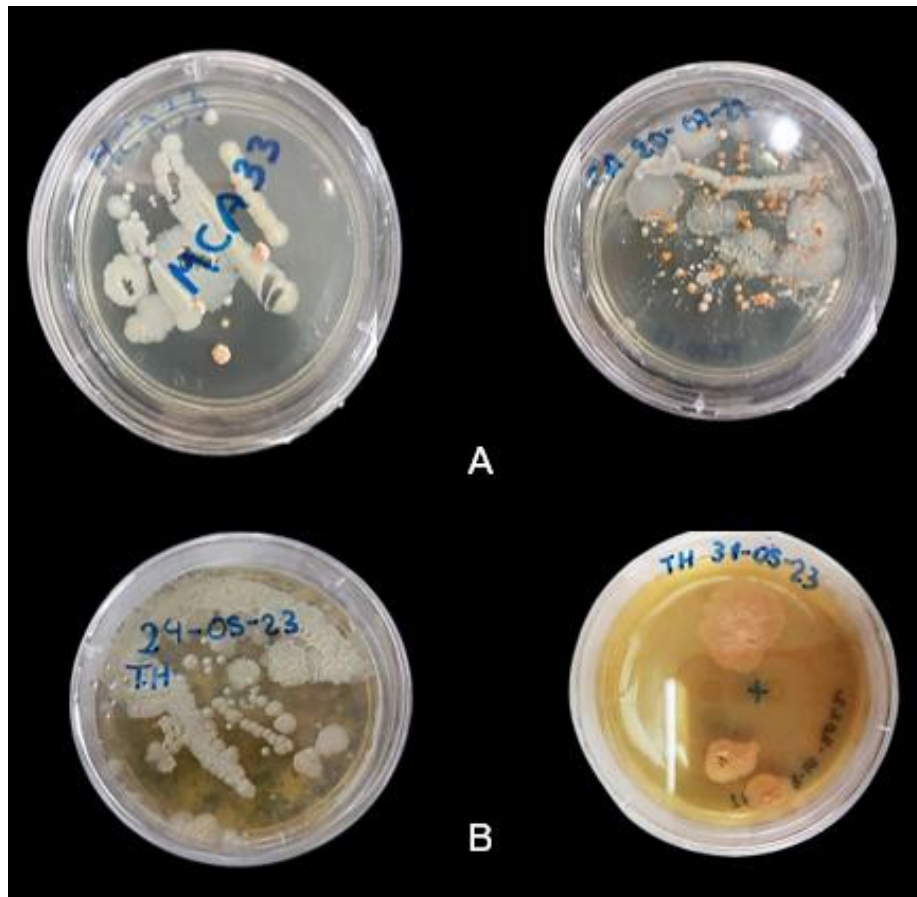


Figura 1S. Cultivos positivos para MNT. (A) MCA, Camara anóxica, (B) MTH Tanque de homogenización.

Realizado por: Morocho, 2024.

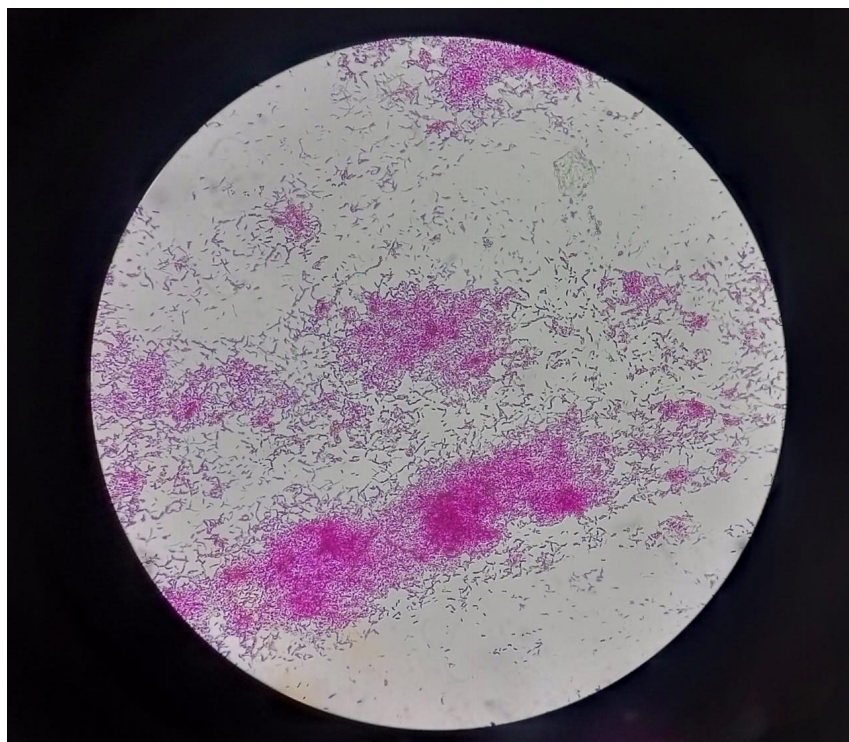


Figura 2S. Visualización de BAAR mediante tinción Ziehl-Neelsen.

Realizado por: Morocho, 2024.

REFERENCIAS

1. Tortone CA, Oriani DS, Staskevich AS, Oriani AS, Gino LM, Marfil MJ, et al. [Species diversity of non-tuberculous mycobacteria isolated from aquatic environments of General Pico city, Province of La Pampa (Argentina)]. *Rev Argent Microbiol.* 2019;51: 259–267. doi:10.1016/J.RAM.2018.08.005
2. Radomski N, Lucas F, Cambau E, Moulin L, Haenn S, Régis M. Programme PIREN-Seine-actions MNT 2008 Développement de méthodes de quantification des mycobactéries non tuberculeuses dans l'eau de la Seine.
3. Sattar A, Zakaria Z, Abu J, Aziz SA, Gabriel RP. Evaluation of six decontamination procedures for isolation of *Mycobacterium avium* complex from avian feces. *PLoS One.* 2018;13: e0202034. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0202034
4. Radomski N, Betelli L, Moilleron R, Haenn S, Moulin L, Cambau E, et al. *Mycobacterium* behavior in wastewater treatment plant, a bacterial model distinct from *Escherichia coli* and enterococci. *Environ Sci Technol.* 2011;45: 5380–5386. doi:10.1021/ES104084C/ASSET/IMAGES/MEDIUM/ES-2010-04084C_0002.GIF
5. Corner LAL, O'Meara D, Costello E, Lesellier S, Gormley E. The distribution of *Mycobacterium bovis* infection in naturally infected badgers. *The Veterinary Journal.* 2012;194: 166–172. doi:10.1016/J.TVJL.2012.03.013
6. Examen Bacteriológico de Aguas: Protocolo de Filtración por Membrana. [cited 2 Feb 2024]. Available: <https://asm.org/protocols/bacteriological-examination-of-waters-membrane-fi>
7. Norma E. Prólogo nacional. 2006.
8. Ditommaso S, Giacomuzzi M, Memoli G, Garlasco J, Curtoni A, Iannaccone M, et al. A New Culture Method for the Detection of Non-Tuberculous *Mycobacteria* in Water Samples from Heater–Cooler Units and Extracorporeal Membrane Oxygenation Machines. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2022, Vol 19, Page 10645. 2022;19: 10645. doi:10.3390/IJERPH191710645
9. Martínez FC. Aislamiento y caracterización genética de micobacterias atípicas en cuerpos de agua de Monterrey, Nuevo León. 2022 [cited 21 May 2023]. Available: <http://eprints.uanl.mx/24425/7/24425.pdf>
10. Hernandez SM, Morlock GP, Butler WR, Crawford JT, Cooksey RC. Identification of *Mycobacterium* species by PCR-restriction fragment length polymorphism analyses using fluorescence capillary electrophoresis. *J Clin Microbiol.* 1999;37: 3688–3692. doi:10.1128/JCM.37.11.3688-3692.1999/ASSET/CCB8D3E2-0995-45E9-B615-62CA01FBAF09/ASSETS/GRAPHIC/JM1190028001.JPEG