



UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM

FACULTAD CIENCIAS DE LA VIDA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**IDENTIFICACIÓN DE MICOBACTERIAS NO TUBERCULOSAS
EN AGUA POTABLE DE ESPACIOS PÚBLICOS EN LA CIUDAD
DE TENA, ECUADOR.**

Proyecto de investigación previo a la obtención del Título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORA: JOSSELYN VANESSA TIPAN ANAGUANO

TUTORA: MSC. YEIMY MARLENE ROJAS DE HIDALGO

Napo - Ecuador

2024

DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD

De mi consideración:

Yo, Josselyn Vanessa Tipan Anaguano con documento de identidad 1755087085, declaro que los resultados obtenidos en la investigación que presento en este documento final, previo a la obtención del título Ingeniera en Biotecnología, 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 el presente documento son de mi autoría y de mi absoluta responsabilidad.

Tena, 27 de febrero de 2024



Josselyn Vanessa Tipan Anaguano
1755087085

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Yo, Josselyn Vanessa Tipan Anaguano con documento de identidad N. ° 1755087085, en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación: Identificación de micobacterias no tuberculosas en agua potable de espacios públicos en la ciudad de 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, 27 de febrero de 2024



Josselyn Vanessa Tipan Anaguano

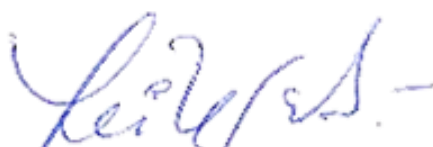
1755087085

CERTIFICADO DE DIRRECCIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN

Certifico que el Trabajo de Integración curricular Titulado: IDENTIFICACIÓN DE MICROBACTERIAS NO TUBERCULOSAS EN AGUA POTABLE DE ESPACIOS PÚBLICOS EN LA CIUDAD DE TENA, ECUADOR en la modalidad de: artículo, fue realizado por Josselyn Vanessa Tipan Anaguano, 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, 27 de febrero de 2024



Yeimy Marlene Rojas de Hidalgo
C.I: 1757847783

AGRADECIMIENTOS

A mi abuela, María, y a mi padre Mesías, por su apoyo incondicional, incluso en los momentos más difíciles.

A todos mis mentores, especialmente a mi tutora, la MSc. Yeimy Rojas por su paciencia y apoyo. Su constante guía y fe en mí, me ha motivado a alcanzar mis metas.

A la Universidad Regional Amazónica Ikiam, por abrirme las puertas a una educación de excelencia y calidad, permitiendo mi formación como profesional del país.

DEDICATORIA

A mi familia, especialmente a mi abuela y padre.

TABLA DE CONTENIDO

DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD.....	ii
AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	iii
CERTIFICADO DE DIRRECCIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
DEDICATORIA	vi
RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
INTRODUCCIÓN	1
MÉTODOS.....	3
Recolección de las muestras	3
Pretratamiento y detección de bacilos ácido alcohol resistente.....	3
Extracción de ADN de las colonias aisladas en muestras de agua potable	4
Amplificación y secuenciación.	4
RESULTADOS	6
DISCUSIÓN	12
CONCLUSIÓN	14
REFERENCIAS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valores de las concentraciones y volúmenes empleados para la preparación del Master mix.	5
Tabla 2. Perfil térmico para la PCR.	5
Tabla 3. Identificación de las especies de MNT en muestras de agua potable de la ciudad de Tena.	6

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de la relación de la red de distribución de agua potable y los espacios públicos.	9
Figura 2. Árbol filogenético de las secuencias obtenidas del gen 16S rRNA con el grupo externo de <i>Nocardia aobensis</i>	10

RESUMEN

Las micobacterias no tuberculosas, son organismos oportunistas que afectan a pacientes inmunodeprimidos, se encuentran en suelos y agua, formando biofilms en tuberías de abastecimiento de agua potable. Representan un foco de infección para la población que consume agua directamente del grifo. El objetivo es identificar molecularmente micobacterias no tuberculosas en agua potable de espacios públicos en Tena. Se seleccionaron siete espacios públicos y tres bebederos de cada lugar. Se recolectó un litro de agua durante tres días, dando un total de 63 muestras, las cuales fueron pretratadas, filtradas con membranas y cultivadas en medio selectivo para MNT. Veinte y seis muestras arrojaron cultivos positivos cuyas colonias fueron confirmadas como bacilos ácido alcohol resistentes. Se identificaron las especies mediante la amplificación y secuenciación de un fragmento del gen 16S rRNA. Las secuencias se analizaron usando la base de datos del GenBank y el software MEGA para el análisis filogenético. Se identificaron las siguientes especies *M. porcinum*, *M. fortuitum*, *M. houstonense*, *M. conceptionense*, *M. neworleansense*, *M. abscessus* y *M. chelonae*. En el árbol filogenético se identificaron 4 clados. Todas las MNT fueron de crecimiento rápido y están asociadas a enfermedades en animales y humanos. Aunque la mayor parte de MNT son inocuas para el ser humano, han demostrado su capacidad para causar brotes infecciosos siendo un riesgo importante para la salud pública.

Palabras clave: Agua potable, micobacterias ambientales, salud pública.

ABSTRACT

Nontuberculous mycobacteria are opportunistic organisms that affect immunosuppressed patients. They are found in soil and water, forming biofilms in drinking water supply pipes. They represent a source of infection for the population that consumes water directly from the tap. The objective is to molecularly identify nontuberculous mycobacteria in drinking water from public spaces in Tena. Seven public spaces and three drinking fountains were selected from each location. One liter of water was collected for three days, giving a total of 63 samples, which were pretreated, filtered with membranes and cultured in selective medium for NTM. Twenty-six samples yielded positive cultures whose colonies were confirmed as acid-fast bacilli. The species are identified by amplification and sequencing of a fragment of the 16S rRNA gene. The sequences were analyzed using the GenBank database and the MEGA software for phylogenetic analysis. The following species *M. porcinum*, *M. fortuitum*, *M. houstonense*, *M. conceptionense*, *M. neworleansense*, *M. abscessus* and *M. chelonae* are identified. In the phylogenetic tree, 4 clades are identified. All NTMs were fast growing and are associated with diseases in animals and humans. Although most NTM are harmless to humans, they have demonstrated their ability to cause infectious outbreaks, being a significant risk to public health.

Keywords: Drinking water, environmental mycobacteria, public health

INTRODUCCIÓN

Ecuador, a pesar de ser un país con abundantes recursos hídricos, enfrenta problemas con la gestión, acceso y calidad de agua. Alrededor del 29.9 % de la población general no cuenta con agua segura, siendo más afectada la región Amazónica, ya que cuenta con menos del 50% de agua libre de contaminantes [1]. Los contaminantes pueden ser de origen químico, físico y/o microbiológico, como es el caso de las bacterias del género *Mycobacterium*, específicamente las denominadas micobacterias no tuberculosas (MNT), son causantes de enfermedades tanto en pacientes inmunocompetentes como inmunodeprimidos, incrementando la preocupación en el sector de la salud, ante la presencia de este tipo de microorganismos [2].

Las MNT se caracterizan principalmente por ser bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR), debido a su pared rica en ácidos micólicos y altamente hidrofóbica, siendo esta afina a la decoloración con la tinción Ziehl Neelsen [3]. Son organismos aeróbicos tolerantes a altas temperaturas, desecación, bajas concentraciones de nutrientes y resisten a la acción de antibióticos y desinfectantes [4]. Algunas especies son capaces de desarrollarse en periodos cortos de 7 días (crecimiento rápido) y otras son de crecimiento lento (hasta tres meses) [5].

Son ubicuas en suelos, polvo y especialmente en agua, donde son capaces de formar biopelículas en las tuberías de distribución [6]. El contagio de MNT es mediante la ingestión de alimentos o agua contaminada o por inhalación de partículas de polvo, y/o por contacto de estas bacterias con heridas en la piel y mucosas [4].

Aunque la mayor parte de MNT no son infecciosas para el ser humano, el incremento de publicaciones científicas, con respecto a casos y brotes, muestran un riesgo importante para la salud pública [7]. Estudios previos en hogares determinan a *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. szulgai*, *M. lentiflavum*, *M. chelonae* y *M. peregrinun* como colonizadoras de tuberías [8], también investigaciones en el agua de hospitales reportan a *M. aurum*, *M. gordonae*, *M. phocaicum*, *M. mucogenicum*, *M. kansasii*, *M. fortuitum* y *M. porcinum* como predominantes [9], incluso existen aislamientos en dispensadores de agua [10].

En Ecuador, desde el año 2016 se ha informado de 4 casos clínicos por MNT en niños y adultos, que presentaban inmunosupresión o recientemente habían atravesado procesos quirúrgicos, entre ellos la infección provocada por *M. scrofulaceum* fue la única atribuida al contacto con agua contaminada [11–14]. En la región Amazónica no existen informes de contagio de MNT, sin embargo, estudios previos a los sistemas de distribución de agua potable de Tena informan sobre el deficiente tratamiento, generando desconfianza en el consumidor [15][16].

Por los antecedentes presentados, la investigación se centró en identificar molecularmente micobacterias no tuberculosas en el agua potable de espacios públicos de la ciudad de Tena y análisis filogenético.

MÉTODOS

Recolección de las muestras

La investigación se realizó en la ciudad de Tena, ubicada a 598 msnm, con temperatura promedio anual de 25 °C y 90% de humedad [17].

Se seleccionaron siete (7) espacios públicos (EP) de la Ciudad del Tena (EP1, EP2, EP3, EP4, EP5, EP6 y EP7). En cada uno de ellos, se eligieron tres (3) bebederos de agua potable como puntos de muestreo. La recolección se realizó siempre en horas de la mañana, entre los meses de mayo y septiembre del año 2023, y siguiendo el Manual de Instrucciones para la Toma, Preservación y Transporte de Muestras de Agua de Consumo Humano para Análisis de Laboratorio [18]. En cada punto, se colectó, un (1) litro de agua dentro de botellas estériles, las cuales fueron posteriormente transportadas en un cooler al laboratorio hasta su procesamiento dentro de las siguientes 3 horas. Se llevaron a cabo tres (3) repeticiones en días diferentes, logrando de esta manera en cada espacio público nueve (9) colectas, con un total de 63 muestras de agua.

Pretratamiento y detección de bacilos ácido alcohol resistente.

Siguiendo el protocolo establecido por Radomski, et al. [19], las muestras se pretrataron con 5 ml de cloruro de hexadecilpiridinio al 1% en 1000 ml de agua durante 20 minutos para eliminar las bacterias que no pertenecen al género *Mycobacterium*. Transcurrido este tiempo, las muestras fueron filtradas con un sistema de succión al vacío ChemVak de WIGGENS model V300B y membranas de MF-Millipore®, tamaño de poro 0,45 µm. Una vez finalizada se colocó la membrana en medio de cultivo Tryptic Soy Broth (TSB) de PanReac AppliChem ITW Reagents con antibióticos (vancomicina, ácido nalidíxico y amfotericina). La incubación se realizó a 37 °C por 72 horas. Posteriormente, se retiró la membrana con una pinza estéril y se continuó incubando a la misma temperatura durante 12 semanas o hasta observar crecimiento de colonias [6]. Las colonias resultantes se evaluaron con la tinción de Ziehl-Neelsen [3].

Extracción de ADN de las colonias aisladas en muestras de agua potable

De las colonias identificadas como BAAR mediante la tinción de Ziehl Nielsen, se extrajo el ADN siguiendo el protocolo propuesto por Koentjoro et al. [20]. Se colocó en 500 µL de Buffer TE 1X un fragmento de la colonia y se llevó al vórtex hasta homogeneizar la mezcla. Luego se incubó a 100 °C durante 8 minutos, y transcurrido ese tiempo, se centrifugó a 15 000 RPM por 5 minutos. Seguidamente, se transfirió a un tubo estéril, 300 µL de sobrenadante (material genético). Para verificar la extracción de ADN se realizó la electroforesis con el tinte SYBR® Safe DNA Gel Stain de Invitrogen, gel de agarosa al 1%. Finalmente, se almacenó a -20 °C, hasta su amplificación.

Amplificación y secuenciación.

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se efectuó en un termociclado ProFlex™ PCR System (Applied Biosystems 4484073), con GoTaq® Flexi DNA Polymerase de Promega® con el primer *forward* A1F (5'-CTGGCTCAGGACGAACGCTG-3') y *reverse* 54R (5'-TCTAGTCTGCCCCGTATCGCCC3') del gen *16S rRNA* [6], bajo el perfil térmico de la **Tabla 1** y concentraciones de la **Tabla 2** [21], con 35 ciclos. Los amplicones se visualizaron en gel de agarosa al 1% con el tinte SYBR® Safe DNA Gel Stain de Invitrogen y escalera molecular de 1 KB en Buffer TBE 1X. Después se envió los fragmentos a secuenciar con el método de Sanger en el Departamento de Servicios de la Universidad de las Américas-Quito y con el analizador genético ABI 3500xL de Applied Biosystems, en el cual el producto de PCR se evidenció por la corrida electroforética capilar en una mezcla realizada con Hi-Di Formamida y marcador interno de tamaño molecular de 600 PB (Liz GS600 de Applied Biosystems).

Las secuencias *forward* resultantes del gen *16S rRNA* se limpiaron en el software Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) versión 11. La identidad de cada secuencia se determinó según el porcentaje de cobertura, el p-value, porcentaje de identidad y la longitud de la secuencia comparada del BLASTn en la base de datos Nucleotide collection del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI). Una vez limpias las secuencias se alinearon con el método de alineación progresiva ClustalW. Adicionalmente, se construyó el árbol filogenético con el algoritmo Maximun

Likelihood [22], la herramienta de alineación MUSCLE, el modelo evolutivo se seleccionó con Models del programa MEGA 11 y con 100 Bootstrap.

Tabla 1. Valores de las concentraciones y volúmenes empleados para la preparación del Master mix.

Reactivos	Concentración	Volumen
Buffer	1X	5 µL
MgCl ₂	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
Tag polimerasa	1 U	0.2 µL
Agua ultrapura	-	9.3 µL
DNA	-	5 µL
	Total	25 µL

Realizado por: Tipán, 2024.

Tabla 2. Descripción del perfil térmico para la PCR de micobacterias no tuberculosas.

Etapas	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	95 °C	5 minutos
Desnaturalización	96 °C	30 segundos
Hibridación	61 °C	30 segundos
Extensión	72 °C	30 segundos
Extensión final	72 °C	10 minutos

Realizado por: Tipán, 2024.

RESULTADOS

De las sesenta y tres muestras evaluadas en los siete puntos estudiados, veinte y seis (41,26 %), mostraron crecimiento de BAAR en el medio de cultivo. Las muestras positivas mostraban en ciertos casos colonias fenotípicamente distintas que se cultivaron nuevamente para obtener cultivos axénicos con un total de 34 BAAR aislados. Todos los aislamientos son de crecimiento rápido debido a que se desarrollaron en menos o igual a siete días. Del total de aislamientos, 10 corresponden a espacio público 1 (29,4 %), 8 a espacio público 2 (23,5 %), 7 a espacio público 3 (20,6 %), 4 a espacio público 4 (11,8 %), 4 a espacio público 5 (11,8%), 1 a espacio público 6 (2,9%) y en ninguna de las muestras colectadas en el espacio público 7 hubo desarrollo de colonias. Todas las colonias presentaron coloración blanquecina, que difieren en su textura (superficies lisas y rugosas). Además, en la última columna (Identidad BLAST) de la **Tabla 3.** muestra el porcentaje de identidad del cual cinco colonias no presentaron 100% de identidad.

Tabla 3. Identificación de las especies de MNT en muestras de agua potable de la ciudad de Tena. N/D: No hubo desarrollo de colonias; EP: Espacio público)

Código	EP	Punto de muestreo	Repetición	Días de crecimiento	Velocidad de crecimiento	Identificación con el gen 16S	Identidad (BLAST %)	
3	EP1	1	N°1	7	Rápida	<i>M. porcinum</i>	100	
5			N°2	6	Rápida	<i>M. porcinum</i>	100	
20.1			N°3	7	Rápida	<i>M. fortuitum</i>	100	
20.2		2		7	Rápida	Secuencia no legible	-	
9				N°1	7	Rápida	<i>M. porcinum</i>	100
6			N°2	7	Rápida	Secuencia no legible	-	
16.2			N°3	7	Rápida	<i>M. porcinum</i>	100	
1			3	N°1	6	Rápida	<i>M. fortuitum</i>	100
13				N°2	7	Rápida	Secuencia no legible	-
18	N°3	5		Rápida	<i>M. porcinum</i>	98.31		
15.5	EP2	1	N°1	6	Rápida	<i>M. houstonense</i>	98.28	
22			N°2	6	Rápida	<i>M. houstonense</i>	99.01	
25.1			N°3	7	Rápida	<i>M. fortuitum</i>	100	
25.2				7	Rápida	<i>M. conceptionense</i>	100	

Código	EP	Punto de muestreo	Repetición	Días de crecimiento	Velocidad de crecimiento	Identificación con el gen 16S	Identidad (BLAST %)
25.3				7	Rápida	<i>M. houstonense</i>	100
-		2	Nº1	-	-	N/D	-
-			Nº2	-	-	N/D	-
-			Nº3	-	-	N/D	-
14.2		3	Nº1	7	Rápida	Secuencia no legible	
33			Nº2	6	Rápida	<i>M. houstonense</i>	100
23			Nº3	7	Rápida	<i>M. porcinum</i>	100
B	EP3	1	Nº1	7	Rápida	<i>M. fortuitum</i>	100
11			Nº2	7	Rápida	<i>M. houstonense</i>	100
-			Nº3	-	-	N/D	-
-		2	Nº1	-	-	N/D	-
17.1			Nº2	7	Rápida	<i>M. porcinum</i>	100
17.2				7	Rápida	<i>M. neworleansense</i>	100
17.3				7	Rápida	<i>M. houstonense</i>	100
-			Nº3	-	-	N/D	-
A		3	Nº1	7	Rápida	<i>M. houstonense</i>	100
-			Nº2	-	-	N/D	-
19			Nº3	6	Rápida	<i>M. porcinum</i>	100
-	EP4	1	Nº1	-	-	N/D	-
-			Nº2	-	-	N/D	-
-			Nº3	-	-	N/D	-
-		2	Nº1	-	-	N/D	-
12			Nº2	7	Rápida	<i>M. neworleansense</i>	100
12.2				7	Rápida	<i>M. houstonense</i>	100
-			Nº3	-	-	N/D	-
10		3	Nº1	7	Rápida	<i>M. fortuitum</i>	100
27			Nº2	7	Rápida	<i>M. houstonense</i>	100
-			Nº3	-	-	N/D	-
-	EP5	1	Nº1	-	-	N/D	-
-			Nº2	-	-	N/D	-
30			Nº3	5	Rápida	<i>M. abscessus</i>	98.57
31				5	Rápida	<i>M. neworleansense</i>	100
32				5	Rápida	<i>M. chelonae</i>	99.6
26		2	Nº1	7	Rápida	<i>M. conceptionense</i>	100

Código	EP	Punto de muestreo	Repetición	Días de crecimiento	Velocidad de crecimiento	Identificación con el gen 16S	Identidad (BLAST %)
-			N°2	-	-	N/D	-
-			N°3	-	-	N/D	-
-		3	N°1	-	-	N/D	-
-			N°2	-	-	N/D	-
-			N°3	-	-	N/D	-
-	EP6	1	N°1	-	-	N/D	-
-			N°2	-	-	N/D	-
-			N°3	-	-	N/D	-
21		2	N°1	7	Rápida	<i>M. houstonense</i>	100
-			N°2	-	-	N/D	-
-			N°3	-	-	N/D	-
-		3	N°1	-	-	N/D	-
-			N°2	-	-	N/D	-
-			N°3	-	-	N/D	-

Realizado por: Tipán, 2024.

Se identificaron siete (7) especies en la investigación: *M. porcinum*, *M. fortuitum*, *M. houstonense*, *M. conceptionense*, *M. neworleansense*, *M. abscessus* y *M. chelonae*. La especie identificada con mayor frecuencia corresponde a *M. houstonense*, mientras que *M. abscessus* y *M. chelonae*, fueron aisladas con menor frecuencia.

La mayor variedad de especies obtenidas se observa en el espacio público 3 y espacio público 5. En cada espacio público hubo variación de hasta cuatro especies por cada lugar y en la distribución, según el punto de muestreo y repetición, dos y tres especies distintas. La especie *M. porcinum* se identificó en EP1, EP2 y EP3; *M. fortuitum* en EP1, EP2, EP3 y EP4; *M. houstonense* en EP2, EP3, EP4 y EP6; *M. conceptionense* en EP2 y EP5; *M. neworleansense* en EP3 y EP5; *M. abscessus* en EP5 y *M. chelonae* en EP5

Figura 1.

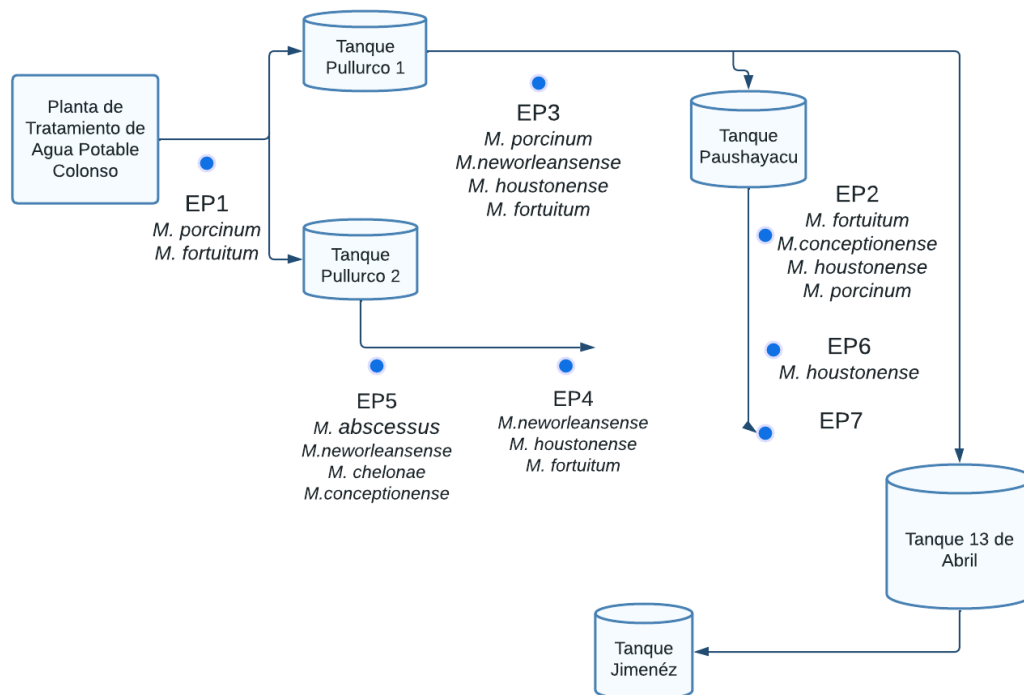


Figura 1. Diagrama de la relación de la red de distribución de agua potable y los espacios públicos.
Realizado por: Tipán, 2024.

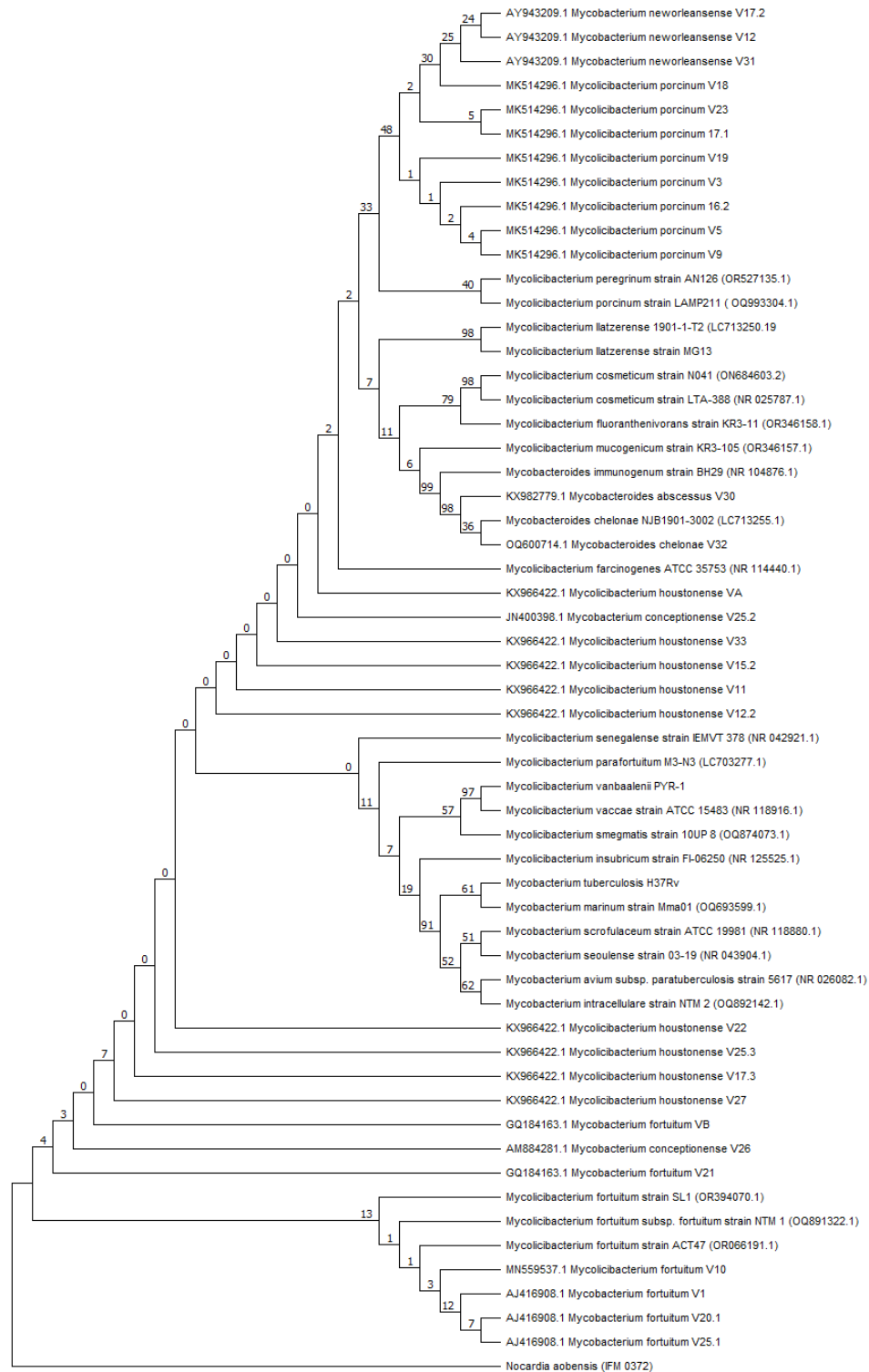


Figura 2. Árbol filogenético de las secuencias obtenidas del *gen 16S rRNA* con el grupo externo de *Nocardia aobensis*. El número de acceso se encuentra entre paréntesis. Las especies encontradas en el estudio están rotuladas con la especie identificada, el espacio público y el código de la colonia aislada.

La especie más cercana a el grupo externo es *M. fortuitum*, seguido de *M. houstonense* y *M. conceptionense*; mientras que *M. porcinum* y *M. neworleansense*, son las especies más distantes. Se han formado 3 clados agrupando a las MNT según su homología. *M. chenolae* y *M. abscessus* se agruparon en un mismo clado y *M. porcinum* y *M. neworleansense* con *M. peregrinum* en otro.

DISCUSIÓN

El presente estudio es el primero en informar sobre la presencia de MNT en agua potable en la región Amazónica. El 41,26% del total de muestras, en los siete puntos evaluados, fueron positivas para MNT. Coincidiendo con estudios en Latinoamérica sobre la presencia de MNT en agua, ya sea en acuíferos o humedales que funcionan como sistemas de abastecimiento [23] o en fuentes de agua y biopelículas de agua corriente de edificios [4]. Incluso se ha aislado MNT de crecimiento rápido en un hospital en Perú, por ello se ha demostrado que el agua y el sistema de distribución son los medios de contagio de micobacteriosis [2].

Las especies identificadas en el estudio corresponden a MNT de crecimiento rápido, concordando con algunos estudios realizados en Latinoamérica y Ecuador [2,4,11–13,23]. Dentro de este grupo se encuentran *M. fortuitum* y *M. chelonae*, aisladas en el estudio con poca frecuencia, *pero* ambas potencialmente infecciosas [4][9]. *M. fortuitum* produce infecciones por dispositivos cardiacos [24], infecciones cutáneas y tejidos blandos [25]. Asimismo, *M. chelonae* es causante de infecciones de la piel y ojos [26]. Estas MNT han sido encontradas en agua dulce, salada y residuales, formando biopelículas en las tuberías, mostrando así su capacidad de permanecer en ambientes inhóspitos y de posible contagio [23].

Otra MNT hallada en suministros de agua es *M. abscessus* responsable de producir infecciones en tejidos blandos, enfermedades diseminadas y pulmonares [27,28]. Sin embargo, solo sé aisló en el espacio público 5. *M. porcinum* aislada en 8/30, está asociada al agua de hospitales responsable de causar infecciones en los ganglios linfáticos, piel y tejidos blandos [29,30]. *M. conceptionense* fue aislada con poca frecuencia, es responsable de causar pneumonitis en pacientes inmunodeprimidos [31]. *M. houstonense* fue la especie más aislada en el estudio, y según la literatura hay reportes de infecciones post-operatorias, óseas e infecciones que afectan al sistema nervioso [32,33].

Los sistemas de distribución y almacenamiento de agua contribuyen a la variabilidad bacteriana y la formación de biofilms en las tuberías, ya que la humedad, temperatura, el constante flujo de nutrientes y el agua estancada favorecen a la colonización de

bacterias en las tuberías [34]. Por ello, al depender de dos tanques de almacenamiento principales, (Pullurco 1 y 2, zona norte) y varios secundarios (Paishayacu, Puerto Napo, Jiménez, 13 de abril) [17], contribuyen al desarrollo de variabilidad de especies en los espacios públicos.

En la **Figura 1.** se observa que en EP1 se aislaron dos especies de MNT. Sin embargo, en todas las repeticiones se desarrollaron colonias y el agua que abastece el lugar viene directamente de la planta de tratamiento de agua potable (PTAP) concordando con estudios previos sobre la ineficiencia de la planta, a pesar de contar con infraestructura adecuada, pero limitados recursos y mayores problemas en invierno [15]. También se observa en la línea de distribución Pullurco 1, que abastece a EP3 y EP2, se mantiene constante la presencia de *M.porcinum* y *M. fortuitum*. Mientras que, en la línea Pullurco 2 está presente *M. fortuitum* y existe crecimiento de otras MNT, es posible que debido a la infraestructura primero el agua ingresa al tanque de Pullurco 1 y luego al siguiente o por la formación de biofilms y la capacidad de resistencias a condiciones adversas de ambas micobacterias [24,29,30,34]. Por otro lado, se aisló más especies de MNT en el espacio público 1 a diferencia del espacio público 7, esto podría explicarse por la antigüedad de la construcción de los sistemas de distribución y los materiales empleados facilitando o limitando la diversidad microbiana [34], ya que espacio público 7 fue recientemente construida a comparación del espacio público 1.

La limitación en el estudio se debió a la ausencia de identificación de los cultivos que tuvieron errores de lectura debido a la desnaturalización del ADN en la extracción impidiendo conocer la variabilidad de especies.

CONCLUSIÓN

Se identificaron siete especies: *M. porcinum*, *M. fortuitum*, *M. houstonense*, *M. conceptionense*, *M. neworleansense*, *M. abscessus* y *M. chelonae* en 6/7 espacios públicos de la ciudad de Tena, siendo el primer estudio en reportar micobacterias en agua potable del país.

Al existir presencia de MNT en fuentes de agua públicas, es primordial por parte de las entidades competentes establecer protocolos de saneamiento en tanques de almacenamiento y sistemas de distribución para controlar la contaminación del líquido vital.

Las MNT aisladas se han descrito como patógenas, como es el caso de *M. abscessus* y *M. chelonae*, representando un riesgo para la población inmunodeprimida. Por ello, se podría optar por implementar medidas propias de desinfección del agua para evitar el contagio, especialmente las personas con el sistema inmunitario afectado.

El desarrollo de MNT es independiente de la distancia que posea desde la PTAP, siendo influenciada por la formación de biofilms y la infraestructura. Además, el flujo de agua es capaz de transportar MNT y debido a la resistencia bacteriana prolifera en otros ambientes.

REFERENCIAS

1. Andrea Molina, Mónica Pozo, Juan Carlos Serrano. Agua, saneamiento e higiene: medición de los ODS en Ecuador. Instituto Nacional de Estadística y Censos y UNICEF (INEC-UNICEF). Quito-Ecuador; 2018.
2. 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. Available: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1657-95502018000200007
3. 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. Biomedica. 2022;42: 460–469.
4. 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. Int J Environ Res Public Health. 2021;18. doi:10.3390/IJERPH18168451
5. Esteban J, Navas E. Treatment of infections caused by nontuberculous mycobacteria. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2018;36: 586–592.
6. Ledesma Y, Echeverría G, Claro-Almea FE, Silva D, Guerrero-Freire S, Rojas Y, et al. The Re-Identification of Previously Unidentifiable Clinical Non-Tuberculous Mycobacterial Isolates Shows Great Species Diversity and the Presence of Other Acid-Fast Genera. Pathogens. 2022;11: 1159.
7. Angélica Scappaticcio B, Maritza Velasco R, Tamara Leiva C, Juan Carlos Rodríguez D. Frequency of environmental mycobacterium in Chile. 2008. Revista Chilena de Enfermedades Respiratorias. 2011;27: 214–222.
8. Atik D, Oksuz S, Ozturk E, Caliskan E, Akar N, Sungur MA. Threat in water for drinking and domestic use: Nontuberculous mycobacteria. Int J Mycobacteriol. 2021;10: 188–192.
9. Moghaddam S, Nojoomi F, Dabbagh Moghaddam A, Mohammadimehr M, Sakhaee F, Masoumi M, et al. Isolation of nontuberculous mycobacteria species from different water sources: a study of six hospitals in Tehran, Iran. BMC Microbiol. 2022;22: 261.
10. Norton GJ, Williams M, Falkinham JO 3rd, Honda JR. Physical Measures to Reduce Exposure to Tap Water-Associated Nontuberculous Mycobacteria. Front Public Health. 2020;8: 190.
11. Palacios Vargas DV, Moya Guerrero IR, Reimundo Díaz DC, Avendaño Saquisilí CV. Mycobacterium terrae: reporte de caso. INSPILIP. 2021; 1–4.
12. Nasre-Nasser R, Muñoz-López G. Infección por Mycobacterium scrofulaceum en un niño de las Islas Galápagos - Ecuador. Rev Chilena Infectol. 2018;35: 705–709.

13. Barros Prieto E, Noboa Freile E, Ruperti Bernal J, Carrión Jumbo P, Barros Castro A. Infección ósea por *Mycobacterium fortuitum* (no tuberculosa). *RevSEOT*. 2021;10: 52–56.
14. Chafra SJC, Macías LGC, Trujillo KAA, Sailema RIM, Olovacha IAM. Micobacteriosis pulmonar por *Mycobacterium kansasii*. *La Ciencia al Servicio de la Salud y la Nutrición*. 2018;8: 13–22.
15. Rodríguez Peñarreta JL, Paredes Rodríguez RE, Tutor SC. Análisis comparativo de las plantas de tratamiento y calidad de agua potable de las ciudades Ambato y Tena, Ecuador. *ESPOL. FICT*. 2022. Available: <http://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/54304>
16. Escobar E, Gabriel J. Propuesta de rediseño y repotenciación del laboratorio de control de calidad de agua potable del Gobierno Autónomo descentralizado Municipal de Tena para el cumplimiento de la norma Inen 1108. 2015. Available: <http://dspace.uniandes.edu.ec/handle/123456789/1716>
17. Gad Municipal del T. Datos geográficos. 2022. Available: <https://tena.gob.ec/WEB/canton.php>
18. López J, Martínez E, Rey G, Nava G. Manual de instrucciones para la toma, preservación y transporte de muestras de agua de consumo para análisis de laboratorio: artículo 27 del decreto 1575 de 2007. 2011.
19. Nicolas Radomski Françoise Lucas Emmanuelle Cambau Laurent Moulin Sophie Haenn Moilleron Régis. Développement de méthodes de quantification des mycobactéries non tuberculeuses dans l'eau de la Seine. 2008 [cited 3 Jan 2024]. Available: http://nicolas-radomski.net/pdf/Actions_PIREN_Mycobacterium_environnement_2008_Nicolas_Radomski.pdf
20. Koentjoro MP, Donastin A, Prasetyo EN. A SIMPLE METHOD OF DNA EXTRACTION OF FROM SPUTUM CULTURES FOR SEQUENCING ANALYSIS. *South Afr J Epidemiol Infect*. 2021;15: 19–22.
21. 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.
22. Fisher AA, Hassler GW, Ji X, Baele G, Suchard MA, Lemey P. Scalable Bayesian phylogenetics. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2022;377: 20210242.
23. Oriani AS, Marfil MJ, Zumárraga MJ, Baldini MD. Prevalence and species diversity of nontuberculous mycobacteria in drinking water supply system of Bahía Blanca City, Argentina. *Int J Mycobacteriol*. 2019;8: 138–145.
24. Shabi Y, Haldane D, Bonnar P. *Mycobacterium fortuitum* pacemaker infection: A case report. *J Assoc Med Microbiol Infect Dis Can*. 2022;7: 81–83.
25. Santi F, Lamberti A, Ciccarese G, Tognetti L, Drago F, Rubegni P, et al. Diffuse *Mycobacterium fortuitum* skin infection after mechanical epilation in an immunocompetent patient. *Ital J Dermatol Venerol*. 2022;157: 520–521.

26. Little JS, Dedrick RM, Freeman KG, Cristinziano M, Smith BE, Benson CA, et al. Bacteriophage treatment of disseminated cutaneous *Mycobacterium chelonae* infection. *Nat Commun.* 2022;13: 2313.
27. Cristancho-Rojas C, Varley CD, Lara SC, Kherabi Y, Henkle E, Winthrop KL. Epidemiology of *Mycobacterium abscessus*. *Clin Microbiol Infect.* 2023. doi:10.1016/j.cmi.2023.08.035
28. Recchia D, Stelitano G, Stamilla A, Gutierrez DL, Degiacomi G, Chiarelli LR, et al. *Mycobacterium abscessus* Infections in Cystic Fibrosis Individuals: A Review on Therapeutic Options. *Int J Mol Sci.* 2023;24. doi:10.3390/ijms24054635
29. Wei W, Luo R, Chen Z, He J. *Mycobacterium porcinum* Infection of Hilar and Mediastinal Lymph Nodes: A Case Report and Literature Review. *Infect Drug Resist.* 2023;16: 7305–7311.
30. Blau EF, Flinchum A, Gaub KL, Hartnett KP, Curran M, Allen VK, et al. *Mycobacterium porcinum* Skin and Soft Tissue Infections After Vaccinations - Indiana, Kentucky, and Ohio, September 2018-February 2019. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2021;70: 1472–1477.
31. Michienzi SM, Burgos RM, Novak RM. *Mycobacterium conceptionense* Pneumonitis in Patient with HIV/AIDS1. *Emerg Infect Dis.* 2019;25: 1986–1988.
32. Wang L, Wang F, Yang C, Luo F. Central nervous system infection caused by *Mycobacterium houstonense*: A case report. *Front Neurol.* 2022;13: 908086.
33. Li Z, Yuan Z, Cao H, Huan D, Qiu Y, Xia T, et al. A case report on *Mycobacterium houstonense* infection after total hip arthroplasty. *BMC Infect Dis.* 2023;23: 722.
34. González E. Formación y desarrollo de biofilm: su impacto en los sistemas de abastecimiento y distribución de agua potable. Universidad Nacional de La Plata. 2017. Available: <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/66667>
35. Wang J, Chen H. Catalytic ozonation for water and wastewater treatment: Recent advances and perspective. *Sci Total Environ.* 2020;704: 135249.