

VALORACIÓN DE CUATRO MÉTODOS de descontaminación para la recuperación de *Micobacterias ambientales de diferentes nichos ecológicos*

Oriani, D.S.¹; Staskevich, A.S.¹; Tortone, C.A.¹; Oriani, A.S.²

Resumen: Cuando se intenta recuperar micobacterias a partir de muestras clínicas o del medio ambiente es necesario emplear métodos de descontaminación que disminuyan la microbiota acompañante. Es posible aplicar métodos drásticos de descontaminación debido a que las micobacterias presentan una compleja estructura de pared. Existen varios métodos propuestos, considerando como método ideal aquel que reduzca al máximo la microbiota acompañante sin disminuir o afectar el número de micobacterias presentes. El objetivo de este trabajo fue determinar la reducción decimal de una suspensión de una cepa de micobacterias ambientales aplicando los métodos de descontaminación propuestos para muestras de suelo, aguas recreacionales, agua de red, y materia fecal. Se determinó un inóculo mixto de bacterias mesófilas (BM) aisladas comúnmente del medio ambiente y otro con una cepa de *Mycobacterium porcinum* recuperada de agua de red. Ambos inóculos se diluyeron hasta alcanzar una suspensión equivalente al tubo 1 de la escala de Mc Farland. Se cuantificó el número real de bacterias siguiendo el método de dilución base 10. Paralelamente se efectuaron tres experiencias para demostrar la reducción decimal al aplicar los distintos métodos de descontaminación cuando se intenta recuperar micobacterias desde suelo (Iivanainen, 1995), humedales (Leite *et al.*, 1989); agua de red (Engel *et al.*, 1980); y materia fecal (Stabel *et al.*, 1997). Los resultados obtenidos en este trabajo demostraron que los métodos de Leite *et al.* (1989) y de Stabel *et al.* (1997) redujeron totalmente el número de bacterias contaminantes mientras que en *M. porcinum* se redujo el número en 3 y 4 log. Aplicando independientemente los métodos de Iivanainen (1995) y Engel *et al.* (1980) se obtuvieron reducciones de 4 log en las BM contaminantes, mientras que para la cepa de *M. porcinum* la reducción osciló

en 2,5 log y 1 log respectivamente. Es importante considerar la reducción del número de micobacterias que ocasionan los diferentes métodos para corregir los valores de los recuentos micobacterianos en las muestras ambientales y también para no excluir ciertos ambientes como posibles hábitats de micobacterias cuando éstas no se recuperan por los métodos convencionales ya que pueden estar debajo del valor de reducción determinado.

Palabras claves: micobacterias, aislamiento, descontaminación.

Analysis of four methods of decontamination to recover environmental mycobacterium in different ecological niches

Abstract: When attempting to recover mycobacterium through lab or environmental samples it's necessary to apply a decontamination method that reduces the accompanying microbiota. It is possible to apply drastic decontamination methods due to the fact that mycobacterium presents a complex wall structure. There are several proposed methods, considering that the ideal method is the one that reduces accompanying microbiota without affecting the number of existing mycobacterium. The objective of this study was to determine decimal reduction of a mycobacterium strain suspension applying the decontamination methods proposed for soil samples, recreational water, tap water and fecal material. A mixed inoculum of mesophilic bacterium was determined (BM) commonly isolated from the environment and another one with a *Mycobacterium porcinum* strain recovered from tap water. Both inoculums were diluted until a suspension equivalent to a 1 tube of the Mc Farland scale was reached. The real number of bacterium was quantified using the dilution method with base 10. At the same time, three experiments were made to

1 Facultad de Ciencias Veterinarias UNLPam.

2 Dpto. de Biología, Bioquímica y Farmacia, UNS. orianids@yahoo.com.ar.

demonstrate decimal reduction when applying different decontaminations methods when trying to recover mycobacterium from soil (Iivanainen, 1995); wetlands (Leite *et al.*, 1989); tap water (Engel *et al.*, 1980); and fecal material (Stabel *et al.*, 1997). Results obtained in this study demonstrated that the Leite *et al.* (1989) and the Stabel *et al.* (1997) methods reduced the total number of contaminating bacterium while the number of *Mycobacterium porcinum* were reduced by 3 and 4 log. Independently applying the methods of Iivanainen (1995) y Engel *et al.* (1980) reductions of 4 log were obtained in BM contaminants while in the *Mycobacterium*

porcinum strain the reduction varied between 2,5 log and 1 log respectively. It is important to consider the mycobacterium reduction by each different method to correct mycobacterium count numbers in the environmental samples and also so that certain environments are not included as possible habitats of mycobacterium when they are not recovered by conventional methods due to the fact that they may be under the determined reduction value.

Key words: mycobacterium, isolation, decontamination.

Introducción

El género *Mycobacterium* caracterizado por agrupar a bacilos no esporulados, inmóviles, ácido alcohol resistentes, con un tiempo de generación comprendido entre 2 y 20 h, reúne a más de 160 especies (Euzéby, 2012), entre ellas las patógenas obligadas como los integrantes del complejo Tuberculosis y Lepra (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. leprae*). Por otro lado, las potencialmente patógenas responsables de algunas micobacteriosis como lo son las especies del complejo MAIS (*M. avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*). Por último, el género *Mycobacterium* contiene un gran grupo de micobacterias saprófitas beneficiosas para el medio ambiente como las especies *M. flavum* y *M. vaccae* involucradas en la degradación de hidrocarburos, además de aquellas que solubilizan fosfatos, e intervienen en la fijación de nitrógeno. Muchas de las especies consideradas ambientales eventualmente pueden ocasionar trastornos en hospedadores tanto inmunocompetentes como inmunocomprometidos que sufren inoculaciones accidentales o que se someten a ciertas prácticas como la mesoterapia y tatuajes (Cooksey *et al.*, 2004; Herreros *et al.*, 2009; Kennedy *et al.*, 2012).

Las micobacterias de los dos últimos grupos son consideradas ambientales debido a que su nicho ecológico es el medio ambiente, no presentan hospedador animal primario y no se ha comprobado aún la transmisión directa entre individuos infectados (Vaerewijck *et al.*, 2005).

Cuando se intenta recuperar micobacterias a partir de muestras clínicas o del medio ambiente, es necesario emplear métodos de descontaminación que disminuyan la microbiota acompañante. Esto se debe a que en el reducido ecosistema que representa la placa de petri o el tubo con medio de cultivo, el tiempo de generación ejerce un valor preponderante. Ante esta desventaja, las micobacterias ofrecen una pared compleja que les permite resistir a fuertes álcalis y ácidos, existiendo varios métodos propuestos como descontaminantes (Kamala *et al.*, 1994).

El objetivo de este trabajo fue determinar la reducción decimal de una suspensión de una cepa de micobacteria ambiental empleando cuatro métodos de descontaminación utilizados para muestras de suelo, aguas recreacionales, agua de red y materia fecal.

\ Materiales y Métodos \

Se trabajó con dos grupos de microorganismos: uno formado por bacterias mesófilas (BM) aisladas comúnmente en el medio ambiente y otro por una cepa de *M. porcinum* aislado de agua de red de la ciudad de General Pico.

Se realizaron dos suspensiones independientes con cada grupo de bacterias (15 mL de cada una), con una turbidez equivalente al tubo 1 de la escala de Mc Farland. Se cuantificó el número real de bacterias siguiendo el método de dilución en base 10.

Se sometió a ambos inóculos a cada uno de los 4 métodos de descontaminación comúnmente utilizados, dependiendo del tipo de muestra a ensayar. Tabla N° 1.

Posteriormente al proceso de descontaminación se efectuó el recuento de BM y de *M. porcinum* sobrevivientes a dicho proceso, determinándose la reducción decimal del número de microorganismos presentes en el inóculo inicial (Madigan *et al.*, 2010).

Tanto en el método de descontaminación para muestras de suelo (Iivanainen, 1995) y el correspondiente a muestras de agua provenientes de humedales (Leite *et al.*, 1989), la muestra debe incubarse 6 h a 35 °C en caldo Müeller Hinton o Cerebro corazón, diluido al 0,1%, para favorecer la germinación de las esporas de otros géneros bacterianos, contenidas en las muestras ambientales. Esta pre incubación al tratamiento químico no se efectuó en esta experiencia ya que se trabajó con una cepa pura de *M. porcinum* y el inóculo referido a bacterias mesófitas no presentaba bacterias esporuladas.

Tabla N° 1. Descripción de los cuatro métodos de descontaminación

Método	Muestra indicada	Desc. químico	Tiempo de contacto	Neutralización
Iivanainen, 1995.	Suelo	NaOH 4% Verde de Malaquita 0,2% (A/A)	30 min (35°C)	H ₂ SO ₄ al 15%
Engel <i>et al.</i> , 1980.	Agua de red	NaOH al 1% y Lauril Sulfato de Sodio al 3% (A/A)	10 min (35°C)	H ₂ SO ₄ al 4%

Continúa>>

Leite <i>et al.</i> , 1989.	Agua de humedales	4% SO ₄ H ₂ (A/A)	10 min (35°C)	Na OH al 30%,
Stabel, <i>et al.</i> , 1997.	Materia fecal	0,9% Cloruro de hexadecilpiridinio	18 hs (22°C)	

A/A: partes iguales.

En los métodos Iivanainen (1995), Engel *et al.* (1980) y Leite *et al.* (1989), posterior a la neutralización, la muestra se concentra y se lava mediante centrifugación durante 15 minutos a 3500 rpm resuspendiéndose con agua destilada estéril. Al pellet obtenido se le efectuaron diluciones en base 10 (10⁻¹ a 10⁻⁶) inoculando por duplicado 100 µL en agar Müeller Hinton para efectuar el recuento de BM y en los medios Löwenstein Jensen y Stonebrink para el recuento de *M. porcinum*.

En el método descrito por Stabel, *et al.* (1997) (utilizado en la recuperación de *M. avium ssp paratuberculosis*) se realizaron las diluciones y posterior siembra con el sedimento que se formó tras la incubación de 18h.

Para la cepa *M. porcinum* (objetivo del trabajo) el ensayo se repitió tres veces, mientras que con las BM se realizó un solo ensayo por duplicado.

\ Resultados \

Los resultados obtenidos se muestran en las tablas 2 y 3.

Tabla N° 2. Inóculo inicial y número de sobrevivientes de bacterias mesófilas y de *M. porcinum* posteriores a los cuatro métodos de descontaminación

	BM UFC/mL	<i>M. porcinum</i> UFC/mL	<i>M. porcinum</i> UFC/mL	<i>M. porcinum</i> UFC/mL
Inoculo inicial	3x10 ⁹	5,7 x 10 ⁸	1 x 10 ⁷	5,7 x 10 ⁸
Iivanainen, 1995.	4,1 x10 ⁵	3,7 x 10 ⁵	1 x 10 ⁷	4,7 x 10 ⁶
Engel <i>et al.</i> , 1980.	2,2 x 10 ³	3,25 x 10 ⁷	1,3x10 ⁶	3,7 x 10 ⁷
Leite <i>et al.</i> , 1989.	SD	1,9 x 10 ⁶	4 x 10 ⁴	2,2 x 10 ³
Stabel <i>et al.</i> , 1997.	SD	5 x 10 ⁵	2,0 x 10 ⁴	1,4 x 10 ⁴

SD: sin desarrollo.

Tabla N° 3. Reducción decimal de BM y *M. porcinum* al aplicar los cuatro métodos de descontaminación

	Reducción del log BM	Reducción del log <i>M. porcinum</i>
Iivanainen, 1995.	4	3- 0- 2
Engel <i>et al.</i> , 1980.	4	1- 1-1
Leite <i>et al.</i> , 1989.	9	2- 3- 5
Stabel <i>et al.</i> , 1997.	9	3- 3 -4

\ Discusión y Conclusiones \

Debido al efecto negativo que representa el lento crecimiento de las micobacterias respecto a la competencia por los nutrientes, es posible descontaminar las muestras ambientales por métodos químicos, basándose en la capacidad que presentan las micobacterias de resistir tratamientos drásticos. Si bien la descontaminación facilita la recuperación de las micobacterias, también se reduce el número de las mismas, aproximadamente el 30% (Kazda, 2009). El método ideal de descontaminación debería ser aquel que redujese al máximo la microbiota acompañante sin reducir el número de micobacterias. Nuestros resultados indican que los métodos de Leite *et al.* (1989) y Stabel, *et al.* (1997) si bien son los que reducen la microbiota acompañante a menos de una unidad formadora de colonia (UFC) también reducen el número de *M. porcinum* en aproximadamente 3 log. Mientras que el método de Iivanainen (1995) y Engel *et al.*, (1980) ejercen menor reducción del número de *M. porcinum* y de las BM respecto a los métodos antes nombrados.

Sería de importancia considerar en estudios posteriores, la reducción del número de micobacterias que ocasionan los diferentes métodos para poder corregir los valores de los recuentos micobacterianos hallados en muestras ambientales, también sería de utilidad para no excluir ciertos ambientes como posibles hábitas de micobacterias, cuando éstas no se logran aislar por los métodos convencionales.

\ Bibliografía \

- Cooksey, R; de Waard, J; Yakrus, M; Rivera, I; Chopite Toney, S; Morlock, G ; Butler, W. 2004. *Mycobacterium cosmeticum* sp. nov., a novel rapidly growing species isolated from a cosmetic infection and from a nail salon. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 54(6):2385-2391.
- Engel, H; Berwald, I; Havelaar, A. 1980. The occurrence of *Mycobacterium kansasii* in tapwater. *Tubercle* , 61:21-26.
- Euzéby, J. 2012. List of prokaryotic names with standing in nomenclature. Available from: www.bacterio.cict.fr.
- Herreros, F; Velho, P; De Moraes, A; Cintra, M. 2009. Cutaneous atypical mycobacteriosis after ultrasound hydrolipoclasia treatment. *Dermatol. Surg.*; 35(1):158-160.
- Iivanainen, E. 1995. Isolation of mycobacteria from acidic forest soil samples: comparison of culture methods. *J. Appl. Bacteriol.*, 78: 663-668.
- Kamala, T; Paramasivan, C; Herbert, D; Venkatesan, P; Prabhakar, R. 1994. Evaluation of procedures for isolation of nontuberculous mycobacteria from soil and water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60: 1021-1024.
- Kazda, J; Pavlik, I; Falkinham III, J; Hruska, K. 2009. *The Ecology of Mycobacteria: Impact on Animal's and Human's Health*. 1° Ed. Springer. Dordrecht Heidelberg London, New York.pp:7-11.
- Kennedy, B; Bedard, B; Younge, M; Tuttle, D; Ammerman, E; Ricci, J, Doniger, A; Escuyer, V.E; Mitchell, K; Noble-Wang, J. A; O'Connell, H.A; William, A; Lanier, W. A; Katz, L.M; Betts, R. F; Gail Mercurio, M; Scott, G.A; Lewis, M. A; Goldgeier, M.H. 2012. Outbreak of *Mycobacterium chelonae* Infection Associated with Tattoo Ink. *N Engl J Med.*; 367: 1020-1024.
- Leite, C, Giannini, M; Falcão, D; Lévy-Frébault, V; David, H. 1989. Presence of *Mycobacterium marinum* and other opportunistic mycobacteria in swimming pool waters in Araraquara, SP. *Rev Microbiol.*; 19: 354-359.
- Madigan, M; Martinko, J. M; Parker, J. 2010. *Brock. Biología de los microorganismos*. 9^{na} Ed. Pearson.
- Stabel, J. 1997. An improved method for cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal samples and comparison to three other methods. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 9, 375-380.
- Vaerewijck, M; Huys, G; Palomino, J; Swings, J; Portaels, F. 2005. Mycobacteria in drinking water distribution systems: ecology and significance for human health. *FEMS Microbiol Rev.*, 29: 911-934.