

Efecto del cloruro de cetilpiridinium y su utilidad como descontaminante para el aislamiento de *Mycobacterium phlei* en muestras de suelo.

Effect of the cetilpiridinium chloride and its decontaminant utility as for the isolation of *Mycobacterium phlei* in soil samples.

Valera Diana, Palencia Johana, García Enrique, Ramírez Ana*

¹ Laboratorio de Microbiología del Suelo, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes (U.L.A), Sector Campo de Oro, Mérida Venezuela.

Recibido octubre 2008 - Aceptado marzo 2009

RESUMEN

Las especies de micobacterias no tuberculosas o atípicas están presentes en muestras ambientales (agua, suelo, materia orgánica, lodo, entre otras). Estos microorganismos afectan principalmente a pacientes inmunosuprimidos, en el caso de los inmunocompetentes, se ven infectados por la inoculación directa (ej., traumatismos). Los estudios realizados para la recuperación de las micobacterias de muestras ambientales es muy limitada por la falta de métodos apropiados y la presencia de una gran cantidad de bacterias y hongos contaminantes que dificultan su aislamiento. El cloruro de cetilpiridinium (CPC) es uno de los descontaminantes utilizado con mayor frecuencia para la recuperación de *Mycobacterium* de muestras ambientales. En tal sentido, en esta investigación, se estableció el efecto del CPC y su utilidad como agente descontaminante para el aislamiento de especies de *Mycobacterium phlei* de muestras de suelo. La muestra utilizada se recolectó de forma no aleatoria, se le inoculó una población conocida de *M. phlei* y se procesó empleando diferentes concentraciones de CPC 0,65%, 0,75%, 0,85%; temperaturas (temperatura ambiente y 37°C) y tiempos de exposición al agente descontaminante (2, 4, 6, 8, 12, 24 horas). Los resultados indican que el CPC al 0,75% durante 2 horas de exposición inhibe de forma representativa el crecimiento de la población de *M. phlei* (1,7%), mientras que la microbiota del suelo disminuyó en menor proporción (4,4%) en las mismas condiciones. Por tal razón, el efecto del CPC sobre *M. phlei* fue mayor que sobre la flora habitual del suelo; esto puede deberse a que la sensibilidad al agente descontaminante varía entre las distintas especies de *Mycobacterium*.

PALABRAS CLAVE

Mycobacterium phlei, micobacterias no tuberculosas o atípicas, cloruro de cetilpiridinium

ABSTRACT

Diverse species of nontuberculous mycobacteria are present in environmental samples (water, soil, organic matter, mud, among others). These microorganisms mainly affect immunocompromised patients, and in the case of the non-immunocompromised, these are infected by direct inoculation (eg. injuries). Studies aimed at recovering mycobacteria from environmental samples are limited by the lack of appropriate methods and the presence of a large number of bacterial and fungal contaminants that hinder their isolation. The cetilpiridinium chloride (CPC) is one of the most decontaminant agents used for the recovery of *Mycobacterium* from environmental samples. In this research, we set up the effect of the CPC and its use as decontaminant agent for the isolation of *Mycobacterium phlei* species from soil samples. To do this, a soil sample, was non-randomly collected and inoculated with a known population of *M. phlei* and processed using different CPC concentrations: 0.65%, 0.75%, 0.85%; incubates at room temperature and at 37 °C, and expose to the decontaminant agent for 2, 4, 6, 8, 12, 24 hours. Our results suggest that a CPC concentration of 0.75% and 2 hours of exposure, significantly inhibit the growth of *M. phlei* (1.7%), whereas the remaining soil microbiota, diminished in smaller proportion (4.4%) in the same conditions. In conclusion, the effect of the CPC was greater on *M.*

phlei population than on the habitual soil microbiota and this can be due to the fact that the sensitivity to the decontaminant agent differs between several *Mycobacterium* species.

KEY WORDS

Mycobacterium phlei, nontuberculous or atypical mycobacteria, chloride of cetilpiridinium.

INTRODUCCIÓN

Los actinomicetos incluyen diversos géneros, algunos de los cuales, son patógenos para animales y el hombre [1]. Dentro de este grupo, encontramos el género *Mycobacterium*, único de la familia *Mycobacteriaceae*. Las micobacterias, según sus características fenotípicas, se clasifican en dos grupos: complejo de micobacterias tuberculosas y micobacterias no tuberculosas o atípicas, estas últimas saprófitas en todos los ecosistemas (suelo, agua, fango, materia orgánica, depósito de alimento para animales, sedimento, vegetales, entre otros) de diferentes zonas climáticas del mundo [2-8].

El papel potencialmente patógeno de las micobacterias no tuberculosas fue valorado a principios de los años 50 y desde entonces, ha existido un interés creciente por conocer el espectro de enfermedades que estas bacterias pueden producir, ya que afectan tanto a individuos inmunocompetentes como inmunocomprometidos. Las infecciones en humanos, se producen por la introducción de las bacterias en los tejidos subcutáneos profundos por medio de traumatismos, accidentes, infecciones de heridas quirúrgicas, agujas de inyección, inserción de un catéter intravenoso y uso de apósitos contaminados o dispositivos protésicos, como las válvulas cardíacas; la enfermedad suele desarrollarse con lentitud, sigue una evolución crónica y desencadena en una reacción granulomatosa [2,6,8-13].

Para el aislamiento de micobacterias atípicas a partir de muestras ambientales, éstas deben descontaminarse antes del cultivo, debido a que presentan una gran cantidad de bacterias y hongos que pueden actuar como contaminantes [3]. Algunas soluciones descontaminantes utilizadas frecuentemente, son tan fuertes que pueden destruir o afectar seriamente a las micobacterias [2]. Las sustancias utilizadas para la descontaminación de muestras ambientales son muy variadas, debido a que no se ha optimizado una técnica que permita obtener cultivos puros de micobacterias provenientes de muestras ambientales [3,14]. Algunas

de ellas son: cloruro de cetilpiridinium (CPC), cloruro de benzalconio, NaOH 1%, ácido oxálico, dodecyl sulfato de sodio (SDS) con diferentes concentraciones de NaOH y cetrimida, entre otras [3,5,14-18].

Es por ello, que el objetivo de este estudio fue establecer el efecto del CPC y su utilidad como agente descontaminante para el aislamiento de *M. phlei* de muestras de suelo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de la muestra

Se recolectaron 100 g de suelo del jardín del Departamento de Microbiología y Parasitología, y se pasaron por un tamiz de 2 mm (Endecotts LTD, London, England). El suelo tamizado se mezcló manualmente durante 15 minutos y 40 g del mismo se colocaron en una placa de Petri estéril.

Preparación de la suspensión bacteriana de *M. phlei*

A partir de un cultivo puro de *M. phlei* se transfirieron colonias a un tubo con solución salina fisiológica (SSF) estéril hasta ajustar a la turbidez del patrón 0,5 de McFarland; luego se realizó una dilución 1:2 de la suspensión con un volumen final de 10 mL.

La cepa de *M. phlei* utilizada se caracteriza morfológicamente por mostrar colonias anaranjadas, con aspecto cerebriforme, bordes ondulados, consistencia seca y densidad opaca.

Inoculación de la muestra de suelo no estéril

De la suspensión bacteriana se tomó una alícuota de 3 mL y se inoculó en 40 g de suelo no estéril, se mezcló con una espátula estéril y se incubó durante 48 horas a temperatura ambiente.

Preparación de la suspensión del suelo inoculado con *M. phlei*

Se pesaron 10 g del suelo inoculado con *M. phlei* y se agregaron en 90 mL de SSF estéril, se agitó durante 20 minutos con un agitador magnético y se dejó en reposo durante 10 minutos. Luego se realizaron las pruebas que se describen a continuación.

Estimación de la población bacteriana de *M. phlei* por el método del número más probable (NMP)

Se tomó 1 mL de la suspensión de suelo inoculado con *M. phlei* y se añadió a 9 mL de SSF estéril. Partiendo de esta dilución (10^{-1}), se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-7} . Se inocularon, por

quintuplicado, 100 μ L de cada una de las diluciones en tubos con agar Löwenstein-Jensen (L-J). Se incubaron a 37 °C durante 1 semana y se revisó diariamente para evaluar si había crecimiento. Para estimar la población bacteriana se utilizaron las tablas del número más probable (NMP) de Woomer [19]. Para estimar que dos poblaciones son significativamente diferentes ($p=0,05$) se utilizó el factor de confianza calculado por este mismo autor [19].

Determinación del efecto del CPC a diferentes concentraciones y tiempo de exposición sobre *M. phlei* incubado a 37 °C y temperatura ambiente

Del sobrenadante de la suspensión de suelo inoculado con *M. phlei*, se tomó 1 mL y se agregó, por triplicado, 1 mL de CPC a cada tubo, en las diferentes concentraciones (0,65; 0,75; 0,85%), durante los siguientes tiempos de exposición: 2, 4, 6, 8, 12, y 24 horas a temperatura ambiente. Al finalizar cada periodo, se centrifugó a 4000 rpm por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y el sedimento se lavó tres veces para finalmente resuspenderlo en 1 mL de SSF estéril. Luego se tomó una alícuota de 100 μ L y se sembró en medio L-J por triplicado. Tres tubos se incubaron a 37 °C y tres tubos a temperatura ambiente durante 4 semanas, se revisaron diariamente (Fig. 1).

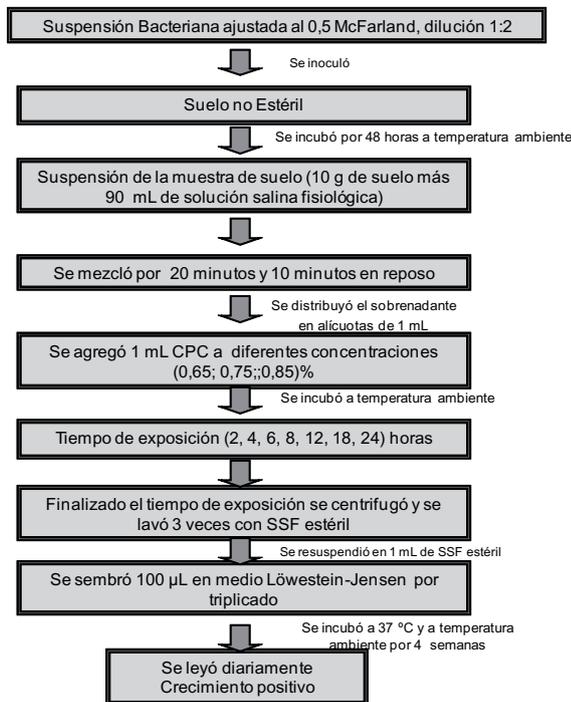


Figura 1. Procedimiento para determinar el efecto del cloruro de cetilpiridium sobre la población bacteriana a las diferentes concentraciones, tiempos de exposición y temperaturas ensayadas.

Estimación de la población bacteriana total en el suelo inoculado con *M. phlei* y efecto del CPC a las 2 horas de exposición

Se tomó 1 mL de la suspensión de suelo inoculado, y se agregó en 9 mL de SSF estéril; partiendo de esta dilución (10^{-1}), se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-8} . De cada una de las diluciones, se sembraron 50 μ L por quintuplicado en una microplaca, la cual previamente contenía 150 μ L de caldo infusión cerebro corazón (BHI). Para estimar la población se compararon los pozos positivos con las tablas del NMP [19]. Este mismo procedimiento se realizó después de las 2 horas de exposición al CPC al 0,75%.

Efecto del CPC al 0,75% a las 2 y 4 h de exposición sobre la población de *M. phlei*, incubado a 37°C

Se preparó una suspensión bacteriana de *M. phlei* como se describió anteriormente, a partir de la cual se tomaron 9 mL, se añadió igual volumen de CPC al 0,75%, dejándolo durante 2 y 4 horas a temperatura ambiente. Luego de cumplido cada uno de los tiempos de exposición, se realizaron 3 lavados como se explicó anteriormente. El sedimento resultante se resuspendió en 2 mL de SSF estéril y se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-7} , de cada una de ellas se tomaron 100 μ L inoculándose por quintuplicado en medio L-J e incubándose a 37 °C durante 4 semanas, revisándose diariamente (Fig. 2).

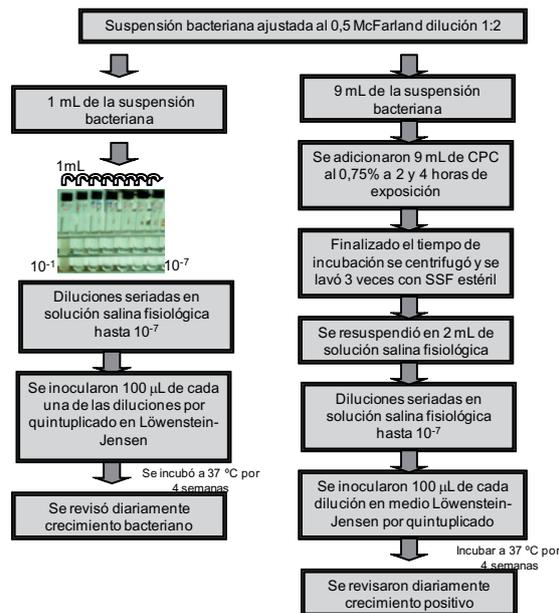


Figura 2. Procedimiento para determinar el efecto del cloruro de cetilpiridium al 0,75 % sobre la población de *M. phlei*.

Para determinar la población bacteriana de *M. phlei* inicial en dicha suspensión, se tomó 1 mL de la misma y se añadió a 9 mL de SSF estéril. Partiendo de esta dilución (10^{-1}), se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-7} . Se inocularon, por quintuplicado, 100 μ L de cada una de las diluciones en tubos con agar Löwenstein-Jensen (L-J). Se incubaron a 37 °C durante 1 semana y se revisó diariamente para evaluar si había crecimiento (Fig. 2). Estimándose la población bacteriana por el NMP [19].

RESULTADOS

Efecto del CPC a las diferentes concentraciones, tiempo de exposición y temperatura de incubación

No se observó una diferencia significativa entre el efecto de las diferentes concentraciones de CPC y temperaturas de incubación (Fig. 3 y 4). Sin embargo, a temperatura ambiente se observó mayor recuperación de *M. phlei* a las 2 y 4 horas de exposición al CPC, comparado con la temperatura de incubación de 37 °C. A esta última temperatura, se observó un crecimiento más rápido y abundante (5 días) en comparación con los tubos incubados a temperatura ambiente (10 días).

Cuando se compara la cantidad de morfotipos coloniales a las diferentes temperaturas e iguales concentraciones del CPC, se observa mayor número de morfotipos coloniales a temperatura ambiente (10 morfotipos) que a 37 °C (5 morfotipos), además, se observó abundante crecimiento de hongos filamentosos a temperatura ambiente, mientras que a 37 °C se inhibió el crecimiento de estos microorganismos (Tabla 1). Debido a la diversidad de morfologías coloniales correspondientes a la microbiota del suelo presente en los cultivos, se les realizó la coloración de Gram para determinar la morfología y tinción bacteriana; resultando mayor predominio de bacilos gramnegativos.

En cuanto a los morfotipos coloniales, se evidenció que a medida que aumentaba el tiempo de exposición disminuía el número de colonias, tanto de los contaminantes como las de *M. phlei*, este comportamiento fue similar a las diferentes concentraciones de CPC y temperaturas ensayadas.

A partir de las 12 horas de exposición al CPC en las distintas concentraciones y temperaturas, no hubo recuperación de *M. phlei*, a diferencia de la población total que presentó crecimiento en las mismas condiciones.

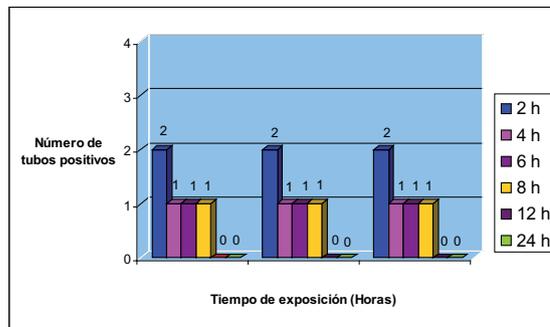


Figura 3. Recuperación de *M. phlei* después de la exposición al CPC a las diferentes concentraciones y a 37 °C

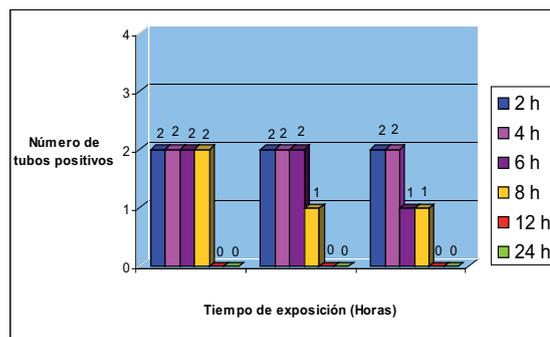


Figura 4. Recuperación de *M. phlei* después de la exposición al CPC a las diferentes concentraciones y a temperatura ambiente.

TABLA 1

Morfotipos coloniales recuperados de la muestra de suelo después de la exposición al CPC a las diferentes concentraciones y temperaturas.

Tiempo de exposición (Horas)	Concentración de CPC					
	0.65%		0.75%		0.85%	
	Temperatura ambiente	37°C	Temperatura ambiente	37°C	Temperatura ambiente	37°C
2	10	5	6	4	6	4
4	7	4	6	4	6	4
6	6	3	6	3	4	3
8	6	3	5	3	4	3
12	4	3	4	2	4	2
24	3	3	3	2	2	2

Las características utilizadas para la diferenciación de los morfotipos coloniales fueron: tamaño, color, densidad, forma, aspecto, bordes y consistencia.

Efecto del CPC sobre la población de *M. phlei* y sobre la población total presente en el suelo a 37°C

La población de *M. phlei* en la muestra de suelo inoculado sin tratamiento con CPC fue de 45320 org/g de suelo húmedo ($4,532 \times 10^4$ org/g de suelo húmedo), al ser sometida al descontaminante disminuyó el 98,28% (780 org/g de suelo húmedo); al incrementar el tiempo de exposición (4 horas) la población disminuyó 1,56% más, respecto a la población de *M. phlei* a las

2 horas (77,0 org/g suelo húmedo) y con respecto a la población inicial disminuyó el 99,84%. Al comparar estadísticamente las poblaciones estimadas a 2 h y 4 h, respecto a la población, se observó una diferencia significativa en relación a los límites de confianza, calculados ($p = 0,05$) (Tabla 2).

TABLA 2

Efecto del CPC al 0,75% sobre la población de *M. phlei* a 37°C.

Tiempo de exposición (Horas)	Límites de confianza	NMP (org/g sh)
0	$1,37 \times 10^4 - 1,49 \times 10^4$	45320*
2	$2,36 \times 10^2 - 2,57 \times 10^2$	780
4	$2,33 \times 10 - 2,54 \times 10^2$	77

*Sin ser sometido al CPC

Factor de dilución: 1/10.
Factor de confianza: 3,30 [19].
NMP: número más probable.

Con relación a la población total, la cantidad de microorganismos del suelo se estimó en 62000 org/g de suelo húmedo ($6,2 \times 10^4$ org/g de suelo húmedo), esta población disminuyó en un 95,55% (2760 org/g de suelo húmedo) a las 2 horas de exposición al CPC, observándose una diferencia estadísticamente significativa al comparar estas poblaciones (Tabla 3).

TABLA 3

Efecto del CPC al 0,75% sobre la población total presentes en la muestra de suelo a 37°C

Tiempo de exposición (Horas)	Límites de confianza	NMP (org/g sh)
0	$1,88 \times 10^4 - 2,05 \times 10^5$	62000*
2	$8,36 \times 10^2 - 9,10 \times 10^3$	2760

*Sin ser sometido al CPC

Factor de dilución: 1/10.
Factor de confianza: 3,30 [19].
NMP: número más probable.

DISCUSIÓN

En el presente estudio se encontró una disminución de la población de micobacterias a medida que aumentaba el tiempo de exposición al CPC a las concentraciones estudiadas. Resultados que coinciden con lo referido por Grant y Rowe [18], quienes señalan que 5 horas o más de exposición al CPC inhibe de forma representativa el crecimiento de la población de *Mycobacterium paratuberculosis*. Además, Thorel y col. [7], no recuperaron micobacterias a 37 °C con 18 horas de exposición al descontaminante y Prosser [3], obtuvo resultados opuestos a los antes mencionados, ya que recuperó de 2 a 10 colonias del complejo *M.*

avium-intracellulare-scrofulaceum (MAIS) a 24 horas de exposición. Esto puede deberse a diferentes factores como son, las características propia del suelo (tipo de suelo, concentración de O₂, CO₂, temperatura y pH) y de las especies de *Mycobacterium* aisladas, siendo unas especies más susceptibles a este compuesto que otras.

Según los resultados obtenidos, se evidencia que la muestra tratada con 0,65% de CPC presenta mayor crecimiento de *M. phlei* y a medida que aumenta la concentración disminuye la población. Estos resultados ratifican lo reportado por Prosser [3], quien demostró que al aumentar la concentración (0,05; 0,2; 1%) del CPC disminuye la población del complejo MAIS. Hecho que tiene importancia desde el punto de vista experimental, por cuanto, la sensibilidad al CPC puede variar de una cepa a otra.

Con relación a la población total, se observó mayor diversidad de morfotipos coloniales en las muestras incubadas a temperatura ambiente, prevaleciendo el crecimiento de hongos, en comparación a las incubadas a 37 °C. Resultados semejantes a los obtenidos por Benson y col. [10], quienes descartaron gran cantidad de muestras debido a la contaminación por hongos. Posiblemente, esto se deba a que el agente descontaminante no elimine las esporas, favoreciendo el rápido crecimiento de los hongos.

La recuperación de *M. phlei* tratada a las diferentes concentraciones de CPC fue mayor a temperatura ambiente que a 37 °C, pero el índice de contaminación fue menor a 37 °C; observándose un comportamiento similar con respecto al crecimiento de la microbiota del suelo en las muestras tratadas a 0,75 y 0,85%. Estos resultados se asemejan a lo reportado por Prosser [3], quien recuperó micobacterias saprófitas con crecimiento de la microbiota del suelo; y a su vez, difieren de lo referido por Parashar y col. [17], debido a que recuperaron en un 100% varias especies (*M. terrae*, *M. avium*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*) sin contaminación; mientras que Thorel y col. [7], no recuperaron micobacterias. Esto puede ser debido a que a temperatura ambiente estos microorganismos crecen con mayor lentitud, lo que favorece el desarrollo de microorganismos de crecimiento rápido presentes en el suelo.

Con relación al efecto del CPC al 0,75% sobre la población de *M. phlei*, es importante destacar que las micobacterias al ser expuestas 2 horas al agente descontaminante, disminuyeron al 1,7% (780 org/g de suelo húmedo) y a las 4 horas al 0,17% (77,0 org/g de suelo húmedo) de la población total (45320 org/g de suelo húmedo); estos resultados nos indican que la acción del CPC sobre las especies de *M. phlei* fue significativa. Resultados que coinciden con la

investigación realizada por Grant y Rowe [18], quienes encontraron que el CPC al 0,75% durante 5 horas fue un tiempo muy prolongado para la recuperación de *M. paratuberculosis*, y contradiciendo lo señalado por Chalbaud [14], quien recuperó gran cantidad de *M. chelonae ss. chelonae* y *M. chelonae ss. abscessus* sin contaminación con la flora habitual del suelo.

De igual manera, la población total disminuyó al 4,5% (2760 org/g de suelo húmedo) a las 2 horas de exposición al CPC con relación a la población total sin exposición al CPC (62000 org/g de suelo húmedo). Comparando estos resultados con el efecto obtenido con la especie de *M. phlei* a las 2 horas de exposición, podemos observar que estas micobacterias se inhiben en mayor proporción (98,3 %) que la microbiota del suelo (95,6 %). Estos resultados difieren de lo señalado por Chalbaud [14], quien señala que la recuperación de micobacterias (*M. chelonae ss. chelonae* y *M. chelonae ss. abscessus*) es óptima a las 4 horas de exposición.

Comparando los resultados obtenidos al exponer ambas poblaciones al efecto del CPC durante 2 horas, encontramos que la población de micobacterias disminuyó en proporciones similares a la población de la microbiota del suelo en las mismas condiciones.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los hallazgos obtenidos en esta investigación, el CPC no es una sustancia descontaminante apropiada para la recuperación de *M. phlei* en muestras de suelo, ya que el efecto de inhibición del crecimiento de la población fue estadísticamente significativo. Además, de que no tiene un efecto descontaminante muy pronunciado.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

[1] Sandoval A y Serrano J. Identificación y Diagnóstico de Actinomicetos Patógenos. Xochimilco (México): Universidad Autónoma Metropolitana; 1996. p 1-5.

[2] Koneman E, Allen S, Janda W, Schreckenberger P, Winn W. Diagnóstico microbiológico. Texto y atlas a color. 5ª Ed. Argentina: Médica Panamericana; 1999. p 875-76.

[3] Prosser, BA. Methods used to investigate a possible environmental source of *Mycobacterium avium intracellulare-scrofulaceum* (MAIS) infection in farmed deer. J Appl Bacteriol. 1989; 66: 219-26.

[4] Kirschner R, Bruce J and Falkinham J. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. Am Rev Respir Dis. 1992; 145: 271-75.

[5] Kamala T, Paramasiva CN, Hebert D, Vencatesan P and Prabhakar R. Evaluation of procedures for isolation of nontuberculous mycobacteria from soil and water.

Appl Environ Microbiol. 1994; 60(3): 1021-24.

[6] Livanainen E, Martikainen P, Vaananen P and Katila M. Environmental factors affecting the occurrence of mycobacteria in brook sediments. J Appl Microbiol. 1999; 86(4): 673-81.

[7] Thorel, M, Falkinham, J, Moreau, RG. Environmental mycobacteria from alpine and subalpine habitats. FEMS Microbiol Ecol. 2004; 49: 343 - 47.

[8] Oriani DS and Sagardoy MA. Nontuberculosis mycobacteria in soil of La Pampa province (Argentina). Rev Argent Microbiol. 2002; 34:132-37.

[9] Ruíz M, Rodríguez J, Escribano I, García J, Rodríguez F y Royo G. Application of molecular biology techniques to the diagnosis of nontuberculous mycobacterial infections. APMIS. 2001; 109(12):857-64.

[10] Benson Z, Ian M, Sian F, Paul F, and Penny R. Distribution of environmental mycobacteria in Karonga District, Northern Malawi. Appl Environ Microbiol. 2006; 72(4): 2343-50.

[11] Ichihama S, Shimokata K y Tsukamura M. The isolation of *Mycobacterium avium* complex from soil, water, and dusts. Microbiol Immunol. 1988; 32(7):733-39.

[12] Yajko D, Chin D, González P, Nassos P, Hopewell P, Reingold A, et al. *Mycobacterium avium* complex in water, food, and soil samples collected from the environment of HIV-infected individuals. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol. 1995; 9(2):176-82.

[13] Brooks G, Butel J, Morse S. Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. 17ª ed. México, D. F.: Manual Moderno; 2002. p 329

[14] Chalbaud A. Aislamiento e identificación de micobacterias a partir de muestras ambientales. [Tesis de Pregrado] Caracas: Universidad Central de Venezuela; 2003.

[15] Livanainen E. Isolation of mycobacteria from acidic forest soil samples: comparison of culture methods. J Appl Bacteriol. 1995; 78: 663-68.

[16] Neumann M, Schulze-Röbbecke R, Hagenau C y Behringer K. Comparison of methods for isolation of mycobacteria from water. Appl Environ Microbiol. 1997; 63(2): 547-52.

[17] Parashar D, Chauhan T, Sharma V, Chauhan A, Chauhan S. and Katoch V. procedures for isolation of mycobacteria from soil and water sample obtained in Northern India. Appl Environ Microbiol. 2004; 70(60): 3751-3.

[18] Grant I y Rowe M. Effect of chemical decontamination and refrigerated storage on the isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from heat-treated milk. Letter Appl Microbiol. 2004; 38: 283-8.

[19] Woormer P. Most Probable Number Counts. En: Mickelson S, Ed. Methods of Soil Analysis. Microbiological and Biochemical Properties. E.E.U.U.: Soil Science Society of America, Inc., 2; 1994.