

ESTUDIO DE LA FLORA LEVADURIFORME DE INTERES MEDICO DE LA
PLAYA DEL HOMBRE EN EL MUNICIPIO DE TELDE-GRAN CANARIA.

RICARDO VALLE SALAS, BIOLOGO.

RESUMEN.

Se ha llevado a cabo un estudio sobre la flora levaduriforme de interés médico en el medio litoral marino de la Playa del Hombre, incluyendo el agua de mar y la arena, tanto seca como húmeda.

El interés de este trabajo concierne al equilibrio biológico, la higiene general, la salud pública y a la educación ambiental.

Han sido aislados distintos géneros en diferentes proporciones según el lugar de procedencia, por lo que se estudia su posible supervivencia en los distintos biotopos del lugar.

Debido al interés en los últimos años por el estudio de las micosis, las especies aisladas son estudiadas desde el punto de vista de su patogenicidad, por lo que se consideran sus posibles implicaciones en los visitantes de la playa.

Junto a las levaduras, se han aislado distintas especies de un alga del género PROTOTHECA, también considerada potencialmente patógena según la bibliografía consultada.

INTRODUCCION

La playa del Hombre, situada en el Término Municipal de Telde, tiene su franja litoral en el sector NE de la isla de Gran Canaria.(Fig.1).

Esta playa se encuentra sometida al vertido directo de desechos de origen urbano y doméstico al medio marino con la consiguiente descarga de agentes contaminantes orgánicos, inorgánicos y microbianos.

Es sabido que el vertido de aguas residuales sin depurar y sin emisarios submarinos trae consigo en primer lugar el riesgo para la salud de los usuarios de la playa,bañistas y visitantes en general. En segundo lugar y no menos importante, el grave deterioro ecológico que se produce en las comunidades tanto vegetales como animales que se asientan y completan sus ciclos de vida en el medio marino litoral. Y en tercer lugar , en lo que se refiere a la conservación medioambiental,la degradación estética a la que esta sometida dicha zona.

El medio marino al recibir un aporte de esta magnitud se convierte en un vector de transmisión de una amplia gama de microorganismos potencialmente patógenos para las personas, que pueden persistir en dicho medio durante cierto tiempo, teniendo cierta probabilidad de reincidir en el huesped produciéndole infecciones de distintas características como pueden ser: Micosis Cutáneas, Micosis Subcutáneas, Enfermedades del Aparato Respiratorio, Afecciones Gastroenterológicas, Hepatitis, etc.

El propósito de este trabajo es aislar y posteriormente identificar los hongos levaduriformes que se encuentran en el agua de mar y en la arena.

Este trabajo surge como resultado del programa de becas que dispone el Exmo. Cabildo Insular de Gran Canaria que tiene lugar en sus centros de investigación, concretamente en el Departamento de Bacteriología del Centro Tecnológico-Pesquero de Taliarte.

DESCRIPCION DE LA ZONA DE MUESTREO.

Como se indica en la figura 1, la Playa del Hombre se encuentra limitada al Sur por la Punta Comisaría, y al Norte por la Playa de la Garita. En ambas playas se asientan urbanizaciones densamente pobladas durante todo el año.

Esta zona se encuentra sometida a la influencia de cinco vertidos de aguas residuales, distribuidos a lo largo de la costa desde Punta Comisaría hasta Punta de la Mareta, de los cuales tres se sitúan en las cercanías de la Estación de Muestreo. De estos tres puntos de vertidos directos, el vertido 3, perteneciente a la Hoya del Pozo, procede de una planta depuradora situada en el barranco de su mismo nombre. El vertido 4 situado en el límite Norte de la Estación de Muestreo, y el vertido 5 en el límite Sur de la misma, por lo que resulta evidente que la situación que se sostiene es crítica en cuanto a la emisión de vertidos sin depurar y sin uso de emisarios submarinos.

La situación geográfica de Playa del Hombre favorece, por su disposición, que esta carga a la que está sometida no se elimine fácilmente, pues el efecto del viento y de las corrientes junto a las mareas hacen que el agua no se renueve con facilidad, por lo que se garantiza la presencia de los microorganismos en el medio.

El viento alisio de componente NE, impide que la descarga de aguas residuales realizada en la costa y en superficie se disperse en el medio por lo que aparece una franja litoral deteriorada. Esto unido al efecto de la corriente marina superficial, de dirección SW, favorece que los vertidos se concentren en la zona de estudio.

La presencia de indicadores biológicos de aguas enriquecidas en su contenido de materia orgánica, como son las algas clorofitas de los géneros Ulva y Enteromorpha, viene a confirmar el impacto ecológico y ambiental que está sufriendo esta zona.

OBTENCION DE LAS MUESTRAS.

Se ha designado un transecto perpendicular a la playa en su zona central, en el cual se han escogido tres puntos para recoger las muestras de arena seca, arena húmeda y agua respectivamente.

El punto A, (figura 2), que se localiza a tres metros por encima del nivel máximo de la pleamar, nos proporciona la muestra de arena seca. El punto B, situado en la franja intermareal, es el utilizado para obtener la arena húmeda. Finalmente en el punto C, situado en el rompiente de la playa, es el utilizado para extraer la muestra de agua de mar.

La toma de muestras es un proceso que no exige equipos complicados. Con la ayuda de frascos de vidrio estériles de 125 ml. de capacidad y un diametro de boca de 30 mm., se lleva

a cabo el muestreo con el máximo de precauciones a fin de evitar una contaminación accidental. Los frascos así llenos, son transportados inmediatamente al laboratorio que, por sus cercanías al mismo, no es necesaria la conservación de las muestras a 0 °C en cajas isoterma.

ARENA SECA.

Debido a la poca bibliografía existente respecto a las técnicas de muestreo de arenas de playas de uso recreativo, siguiendo los criterios de BOIRON et al. , la muestra la recogemos a una profundidad entre 5 y 15 cm. a fin de descartar el efecto solar sobre la arena superficial, utilizando una espátula estéril y recogiendo cantidades de arena de unos 50 gramos aproximadamente, que posteriormente introducimos en los botes de cristal.

ARENA HUMEDA

Para la obtención de muestras de arena húmeda, nos situamos en la banda de arena que, estando húmeda, no esté en el influjo directo del agua de mar en el momento del muestreo.

Se extraen 50 gramos de arena húmeda superficial y se introducen en el frasco de vidrio correspondiente para ser transportado al laboratorio.

AGUA DE MAR.

Se recogen 100ml. de agua de mar poco profunda, abriendo y cerrando el frasco de vidrio debajo del agua y se transporta posteriormente al laboratorio.

AISLAMIENTO DE LAS LEVADURAS.

El proceso de aislamiento de los hongos levaduriformes depende del medio del que se quieran aislar. De este modo, el tratamiento de las muestras ya obtenidas será distinto según proceda de las aguas o de las arenas. A continuación se mencionan las técnicas utilizadas en este trabajo según sea la procedencia de las muestras.

1. AGUAS DE MAR.

Para el aislamiento de hongos levaduriformes procedentes del agua de mar, se diluyen 10 ml. de agua de la muestra en 50ml. de agua destilada estéril agitándose vigorosamente. Posteriormente se filtra a través de una membrana filtrante de 0.45 μ m. de diametro de poro, (Millipore, Co). Esta operación se realiza por triplicado. Una vez filtradas las cantidades mencionadas, los filtros se siembran en placas de Petri de 55 mm. de diametro conteniendo 10ml. de agar Sabouraud modificado (DIFCO), al que se le ha añadido 0.5gr/1000ml. de Cloranfenicol como antibiótico para evitar la proliferación de bacterias oportunistas procedentes de la muestra. Las placas se incuban a una temperatura de 27 °C durante tres, cinco o siete dias hasta que el desarrollo de las colonias sea apreciable. En este momento son nuevamente sembradas por triplicado hasta garantizar la presencia de una sola cepa por placa, que es conservada en tubos conteniendo agar inclinado de Sabouraud y tapa con rosca hermética.

2. ARENAS.

Se pesa esterilmente 1 gramo de arena al que se le añaden 10 ml. de agua destilada estéril añadida de Cloranfenicol 0.1gr/1000ml. y Tween-80 a una concentración de 0.2gr/1000ml. Se agita vigorosamente durante 5 minutos. Series de 0.2ml. de sobrenadante son sembrados por triplicado en placas de Petri de 55 mm. de diametro conteniendo 10ml. de Agar Sabouraud modificado (DIFCO) añadido del mismo antibiótico anteriormente citado. Las placas así sembradas son incubadas a una temperatura de 27 °C durante tres, cinco o siete días hasta la aparición de las colonias. Las colonias son resembradas hasta asegurarse de la presencia de una sola cepa por placa. Las cepas así obtenidas son conservadas en tubos con tapa de rosca hermética conteniendo el mismo medio inclinado.

En el caso que hubiese un desarrollo excesivo en las placas iniciales, habría que proceder a diluir las muestras originales a cantidades de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , etc. extrapolándose luego los resultados, multiplicando los resultados por los factores de dilución.

DETERMINACION DE LAS LEVADURAS.

Para la identificación de las levaduras aisladas es necesario realizar una serie de pruebas relacionadas con su morfología, tanto macroscópica como microscópica así como una serie de pruebas bioquímicas que serán determinantes para cada

especie.

1. MORFOLOGIA MACROSCOPICA.

En relación al estudio macromorfológico se han realizado una serie de observaciones complementarias que, ayudadas del resto de las pruebas, nos darán como resultado final la identificación genérica y específica de la cepa aislada. Entre ellas caben destacar el tamaño de la colonia a los siete días de desarrollo, color de la colonia, consistencia, olor, textura, brillo, forma del borde, etc.

2. MORFOLOGIA MICROSCOPICA

El examen microscópico de los hongos levaduriformes está enfocado por una parte al estudio de las unidades celulares que conforman la colonia. Se pueden definir las levaduras como microorganismos pertenecientes a los hongos cuya forma básica de vida vegetativa es la unicelular, estando sus células separadas unas de otras, sin guardar orden alguno. El micelio, por tanto, está representado por el conjunto de células, que pueden ser acicular, cilíndrica, navicular, campanulada, esférica, ovoidea, etc.

La reproducción vegetativa tiene lugar por mecanismos de gemación en los que una célula madre emite una o varias yemas, llamadas blastosporas, y a medida que estas yemas aumentan de tamaño, se produce una estrangulación que dará como resultado final la separación de la célula hija de la célula madre.

Por otra parte el estudio microscópico aborda las posibles modificaciones que pueda presentar el micelio. En este sentido cabe señalar la facultad que poseen algunas

especies de levaduras de emitir brotes laterales a partir de de una célula originando filamentos parecidos a las hifas con la particularidad que en las zonas de estrangulamiento se desarrollan nuevas blastosporas dando lugar a un pseudomicelio filamentososo.

En medios de cultivo especiales, (Agar Patata-Zanahoria-Bilis), estos pseudomicelios pueden dar lugar a formas de resistencia denominadas clamidosporas, elementos esféricos de gran tamaño (6-12µm. de diámetro), de paredes gruesas, refringentes y muy resistentes al calor y a la desecación que permiten la supervivencia de la especie en ambientes desfavorables.

La observación microscópica ha de realizarse con el máximo de precauciones, pues se está trabajando con un material biológico que está mantenido en condiciones óptimas de cultivo por lo que el riesgo de infección es patente. Para ello se sugiere la utilización del fijador Lactofenol Azul de Amman así como la eliminación de este material después de su estudio por inmersión en hipoclorito sódico durante 24-48 horas antes de ser autoclavado a 121 °C durante 30 minutos.

3. PRUEBAS COMPLEMENTARIAS.

el estudio microscópico de los hongos levaduriformes está acompañado de una serie de "test" o pruebas complementarias también dirigidas a la identificación de las especies en cuestión. En este trabajo se han realizado las pruebas que a continuación se detallan:

3.1.OBSERVACION DE CAPSULA.

La presencia de cápsula es un caracter taxonómico para el género Criptococcus.

Esta prueba complementaria consiste en hacer observable al microscópio la cápsula que envuelve a las celulas de la especie en cuestión. Para ello, en un portaobjetos se pone una gota de suero fisiológico a la que se le añade una gota de tinta china(Pelikan heliografiable), diluida al 50%. Con ayuda del asa se homogeniza una pequeña porción de la colonia y se observa al microscópio.

El tamaño del pigmento de la tinta china es tan fino que pone de manifiesto la existencia de la cápsula.

3.2.PRUEBA DE FILAMENTACION EN SUERO.

Tambien denominada "Prueba de Taschdjan", tiene interés para diferenciar las especies C.albicans y C. stellatoidea del resto de las especies del mismo género.

Esta prueba se fundamenta en la capacidad que poseen las especies antes mencionadas de producir pseudomicelio en determinadas condiciones. Para ello se siembra un inóculo muy poco concentrado en uno o dos ml. de suero humano o de caballo, incubandose posteriormente a 37 °C durante 2-3 horas. La lectura se realiza mediante el examen microscópico en fresco.

3.3.MORFOLOGIA SOBRE Y.M.A.

Este medio ha sido preparado para estudiar las

características coloniales y morfológicas utilizando Yeast Morphology Agar (DIFCO).

El fundamento de esta prueba consiste en observar las modificaciones que se producen en las células cuando estas son sembradas en este medio, especialmente la formación de pseudomicelios.

Una vez preparado el medio, se realiza una inoculación con un solo rayado cerca de un lado de la placa y además se realizan dos inoculaciones por puntos cerca de los otros lados de la placa. Una sección central de la inoculación por rayado y una de las inoculaciones por puntos se cubren con cubreobjetos estériles. Las placas así sembradas son incubadas durante 6-7 días a 20 °C y se observa después al microscopio utilizando un objetivo alto y seco.

Este carácter es importante para la posterior identificación de la especie, pues está incluido en el perfil numérico que se obtiene en la prueba de asimilación de carbohidratos.

4. ASIMILACION DE CARBOHIDRATOS.

La identificación bioquímica de las levaduras se lleva a cabo utilizando el sistema de identificación API 20C AUX, que ha sido desarrollado para proporcionar una identificación completa de las levaduras que se encuentran en el campo clínico en 24, 48 ó 72 horas, teniendo en cuenta la morfología.

El fundamento del sistema API 20C aux, consiste en una galería de 20 cúpulas y un medio de cultivo para la

identificación de las levaduras mas frecuentes en el campo clínico (Candida, Cryptococcus, Torulopsis, Trichosporum, Rhodotorula).

Una vez obtenidas las colonias de morfología idéntica, se toma, con ayuda del asa, una porción de colonia y se suspende en 2 ml. de suero fisiológico estéril hasta alcanzar la concentración celular deseada (turbidez correspondiente al número 2 de la escala de M^C Farland, equivalente a una concentración microbiana de 10⁴ células/ml.)

A partir de esta suspensión de células, se añaden unas gotas al medio API 20C, se homogeniza y se inoculara en las cúpulas que contienen cantidades suficientes de azúcares para valorar la reacción. Posteriormente se incuba a 30 °C durante 24, 48 ó 72 horas.

La lectura se realiza estableciendo comparaciones de la turbidez obtenida respecto a la turbidez del control. La identificación se realiza con ayuda del índice numérico obtenido.

RESULTADOS.

El conjunto de pruebas que se han expuesto permite la determinación de la especie en la totalidad de las cepas estudiadas.

1.- De los muestreos realizados, se han aislado un total de 19 cepas, agrupadas en tres géneros de hongos levaduriformes (Torulopsis, Candida, Trichosporon), y un género de alga cloro

fíceca (*Prothoteca*).

Las especies identificadas, sus lugares de aislamiento así como sus frecuencias de aparición están resumidas en la tabla 1.

El género *Candida* es el mayoritario, pues representa el 50% del total de levaduras aisladas, siendo identificadas las especies *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*, ambas aisladas del agua de mar.

Los géneros *Torulopsis* y *Trichosporon* representan el 25% respectivamente del total de levaduras aisladas, estando el primero de ellos igualmente presente en los tres puntos estudiados de la playa, mientras que el resto de las levaduras están presentes en el agua de mar, a excepción del alga *P. zopfii* que fue aislada tanto en agua como en arena húmeda.

2.- Las características microscópicas de las cepas estudiadas (crecimiento sobre .Y.M.A.) así como las pruebas complementarias se resumen en la tabla 2.

En ninguna de las cepas estudiadas se observó filamentos en suero humano. Tampoco se observó cápsula (características propias de otras especies no aisladas en este estudio).

Solo se observó pseudomicelio en las especies pertenecientes al género *Candida*, cuando se cultivaron en medio adecuado.

Por otra parte, el género *Prototheca* no presenta ninguna característica micromorfológica que lo asemeje a un hongo levaduriforme.

3.- Se han aislado dos especies del género Prothoteca. En primer lugar, P.zopfii con una alta incidencia tanto en el agua de mar como en la arena húmeda, representa un 86% del total del género y un 31% del total de las cepas aisladas.

En segundo lugar se ha aislado P.stagnora solamente en el agua de mar, correspondiente a una incidencia del 14.2% del total del género y un 15% del total de las cepas aisladas.

COMENTARIOS Y DISCUSION.

Conociendo las limitaciones que presenta el desarrollo de este trabajo tanto en el espacio (zona de muestreo), como en el tiempo (Periodo de muestreo), no es posible obtener conclusiones globales y estadísticas respecto a la flora levaduriforme que se asienta en la zona, pero puntualmente se hace notable el número de cepas aisladas, lo que nos proporciona una idea de su abundancia.

En primer lugar, teniendo en cuenta los volúmenes filtrados durante el proceso de aislamiento, si expresamos los resultados en términos de Colonias Aisladas/Volumen filtrado o gramo de arena, podremos cuantificar la abundancia de las levaduras en los distintos puntos estudiados, tal como queda reflejado en la tabla 3. En este sentido, del total de cepas aisladas, tanto la arena húmeda como el agua de mar presentan cantidades análogas de Unidades Formadoras de Colonias (U.F.C.), mientras que la abundancia es claramente menor en la arena seca.

Si referimos los resultados al total de levaduras aisladas (exceptuando por tanto el género Prothoteca), la abundancia es doblemente mayor en el agua de mar que en la

arena tanto seca como húmeda.

En segundo lugar, se intenta precisar el origen de estas levaduras. En este sentido, caben dos alternativas: Pertenecen al medio marino o son consecuencia de la polución de origen doméstico que afecta a la zona. En cualquier caso, los datos son insuficientes para permitir dedicciones válidas, aunque la presencia de los géneros Candida y Prothoteca nos lleva a pensar que el origen no es propiamente marino sino producto de la contaminación fecal de la zona, pudiendo, algunas cepas, sobrevivir en un medio ajeno.

En tercer lugar, todos los géneros aislados están asociados a algun caracter patógeno para el ser humano.

Debido a que la capacidad de supervivencia de los microorganismos estudiados es mayor que la capacidad autodepuradora del medio marino, este se convierte en un reservorio y vehículo de dispersión de estos microorganismos que al estar tan densamente representados en el medio, pueden retornar al usuario de la playa, con el consiguiente riesgo para la salud.

CONCLUSIONES.

1.- Se han aislado cepas de hongos levaduriformes que tienen asociado un caracter patógeno para el hombre.

2.- La arena seca es la que reúne mejores condiciones para evitar el contacto entre el microorganismo patógeno y el huésped. La abundancia está claramente disminuida en esta banda de arena seca.

3.- Los mismos géneros de levaduras son encontrados en la arena húmeda y en el agua de mar, por lo que parece razonable concluir que tienen el mismo origen.

RECOMENDACIONES.

1.- Se desaconseja el uso de la playa para los bañistas y paseantes al encontrarse altamente contaminada tanto por una flora bacteriana como micológica potencialmente patógena para el hombre.

2.- Se recomienda la rápida intervención de las entidades y autoridades competentes para buscar una solución a este continuo y progresivo deterioro del medio ambiente que está produciendo un desequilibrio ecológico y una degradación estética.

3.- Se recomienda un plan de estudio periódico para valorar globalmente el estado de la zona así como un plan de seguimiento de la recuperación y evolución de la higiene de la zona una vez se tomen las medidas adecuadas.

AGRADECIMIENTOS.

Este breve estudio ha sido realizado en el marco de los programas de Becas que dispone el Exmo. Cabildo Insular de Gran Canaria y se ha desarrollado en el Departamento de Bacteriología del Centro Tecnológico-Pesquero de Taliarte. Agradezco, por tanto, toda la ayuda prestada por el personal de este Centro quienes han colaborado técnicamente para el buen desarrollo del mismo.

Agradezco también la ayuda directa prestada por el personal del Departamento, a D. Leopoldo O 'Shanahan Roca, quien ha dirigido este trabajo y ha orientado el desarrollo del mismo.

Agradezco asimismo la ayuda incondicional prestada y la labor realizada por el Laboratorio de Investigaciones Microbiológicas y Análisis Clínicos a cargo de D. Emilio Valle Ramos y Esposa quienes han colaborado aportando sus conocimientos y materiales de trabajo para el buen desarrollo de este estudio.

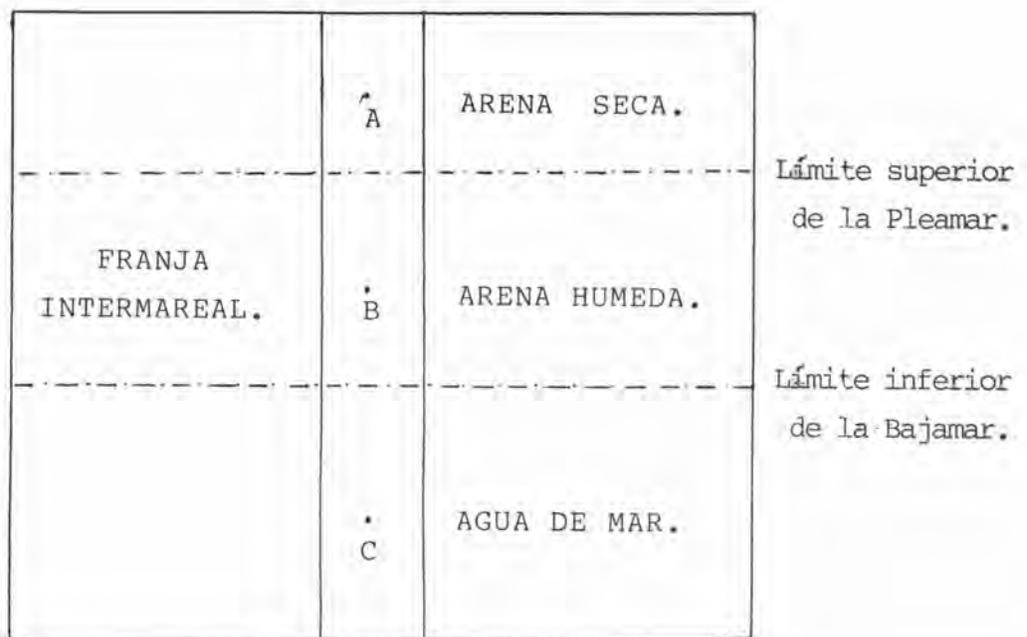


FIGURA 2.- Representación del transecto del cual se extraen las muestras (A,B,C.).

TABLAS.

GENERO	ESPECIE	Nº Col.	FRECUENCIA	A.S.	A.H.	AGUA.
TORULOPSIS	<u>T.candida</u>	3	3/19 (15.78%)	1	1	1
CANDIDA	<u>C.parapsilosis</u>	4	4/19 (21.05%)	0	0	4
CANDIDA	<u>C.tropicalis</u>	2	2/19 (10.52%)	0	0	2
TRICHOSPORON	<u>T.capitatum</u>	3	3/19 (15.78%)	0	0	3
PROTHOTECA	<u>P.zopfii</u>	6	6/19 (31.57%)	0	3	3
prothoteca	<u>P.stagnora</u>	1	1/19 (5.26%)	0	0	1

Tabla 1. Relación de especies aisladas, frecuencias y lugar de procedencia. Nº Col.: número de colonias aisladas. A.S.: Arena seca. A.H.: Arena húmeda.

ESPECIE	BL	PH	CL	FP	CAP
<u>T.candida</u>	+	-	-	-	-
<u>C.parapsilosis</u>	+	+	-	-	-
<u>C.tropicalis</u>	+	+	-	-	-
<u>T.capitatum</u>	+	-	-	-	-
<u>P.zopfii</u>	-	-	-	-	-
<u>P.stagnora</u>	-	-	-	-	-

Tabla 2. Características micromorfológicas y desarrollo sobre Y.M.A. de las especies aisladas. BL: Blastosporas. PH: Pseudohifas. CL: Clamidosporas. FP: Filamentación precoz. CAP: Cápsula.

	ARENA SECA	ARENA HUMEDA	AGUA DE MAR
UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS TOTALES.	16.6	66.6	46.6
NUMERO DE COLONIAS DE LEVADURAS.	16.6	16.6	33.3

Tabla 3. Valores obtenidos para la abundancia de las levaduras en los distintos puntos estudiados. Los valores están calculados por gramo de arena (en la arena seca y húmeda), y para 100ml. en el agua de mar.


20.06.88

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- APHA,AWWA,WPCF.1985.Standard Methods for examination of Water and Wastewater.16 th. edition. 1268pp.
- 2.-BOIRON,P.;AGIS,F. et al.Etude de la flore levuriforme d interet medical de la plage de Sainte-Anne en Guadeloupe.Bull.Soc.Path.Ex,76 ,1983. 351-356.
- 3.-BOIRON,P; AGIS,F.Etude preliminaire de la flore levuriforme d interet medical observee en milieu marin littoral en Guadeloupe.Bull.Soc.Path.Ex,75,1982. 272-278.
- 4.-BRISOU,J.F.;DENIS,F.A. Hygiene de l'environnement maritime. Masson. Paris.1978.218p.
- 5.-FOZ,A.;ANGLADA,J. et al. Especies del género Candida aisladas de productos patológicos humanos.Med,Clin. Vol.65, Nº 3 1975. 118-123.
- 6.-LASKIN,A. ;LECHEVALIER,H. CRCHandbook of microbiology. 2ª Ed. Vol.2. CRC Inc. Press.1978.