

ESTUDIO DE LA PRESENCIA DE ALGAS PATOGENAS DEL GENERO PROTOTHECA

EN LA PLAYA DEL HOMBRE. ( TELDE, GRAN CANARIA ).

RICARDO VALLE SALAS, BILOGO.

ESTE TRABAJO HA SIDO REALIZADO GRACIAS A LA CONCESION DE  
UNA BECA DE INVESTIGACION POR EL EXMO. CABILDO INSULAR DE  
GRAN CANARIA Y SE HA LLEVADO A CABO EN EL CENTRO TECNOLO-  
GICO-PESQUERO DE TALIARTE.

EL COORDINADOR DEL CENTRO:  
D. PRUDENCIO GUZMAN N.

EL DIRECTOR DEL TRABAJO;  
D. LEOPOLDO O'SHANAHAN R.

EL BECARIO Y AUTOR:  
RICARDO VALLE SALAS.



## 1. RESUMEN.

Se ha llevado a cabo un estudio sobre la presencia de un grupo de algas 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(11), por lo que se da cuenta sobre este grupo de microorganismos debido a la cada día mas frecuente descripción de afecciones humanas provocadas por estos.

En la actualidad está totalmente aceptado su poder patógeno y ha dado lugar a una nueva enfermedad humana denominada PROTOTHECOSIS.(7)

Las algas del género PROTOTHECA, han sido aisladas en numerosos habitats en diferentes países(6), habiéndose siempre relacionado su existencia con el agua de diferente tipo. En este sentido, se realizó esta investigación con resultados positivos en diferentes puntos de una estación costera, que ahora se describen respecto a la presencia de estos agentes.

Para su aislamiento se han utilizado medios no selectivos. Se procedió a su identificación mediante criterios bacteriológicos simples como aspecto macroscópico de las colonias, aspecto microscópico, criterios bioquímicos como utilización y fermentación de azúcares.

Se realizaron un total de 42 tomas de muestra, de las cuales 14 correspondían a la arena seca, 14 a la arena húmeda y las 14 restantes al agua de mar que baña a la playa.

Se aislaron un total de 16 cepas de Prototheca sp. y se identificaron posteriormente en su totalidad las cuales han resultado ser en un 56.2% Prothoteca wickerhamii, en un 25 % P.zopfii, y en un 18.8% P.stagnora, encontrándose en su mayo

ría en ambiente húmedo o acuoso.

Se compara a su vez la abundancia de estas especies en relación con otros organismos aislados de los distintos biotopos estudiados( Hongos de micelio definido y Hongos levaduriformes),

## 2. INTRODUCCION.

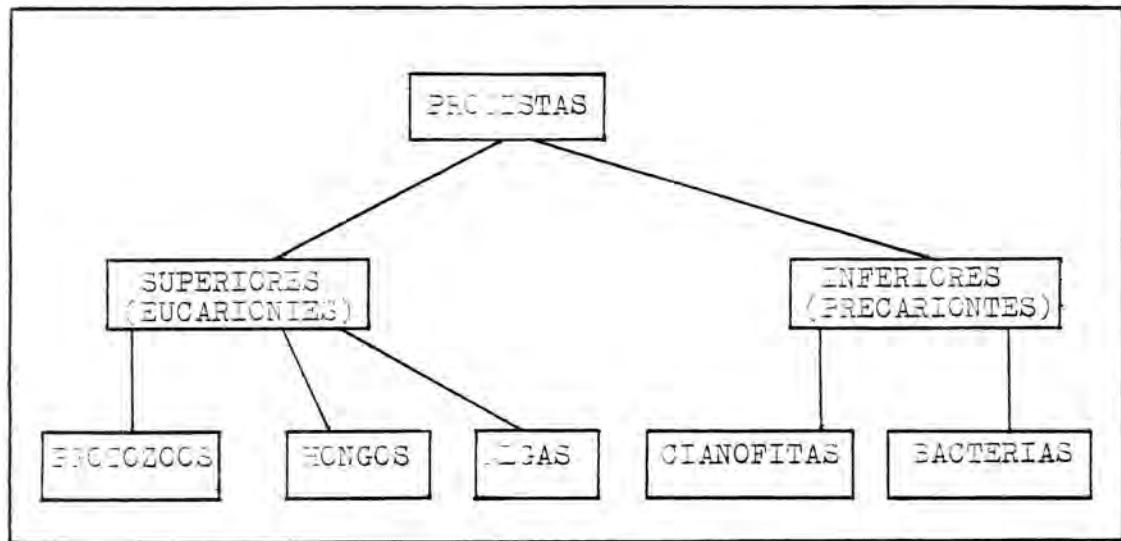
### 2.1. DESCRIPCION DEL GENERO.

Las algas del género Prototheca, aunque conocidas desde muy antiguo, ( KRUGER,1894), no se habian relacionado de manera definitiva con la patología humana hasta el año 1964 en que DAVIES et al. describen el primer caso humano. (8).

Existen muy pocas referencias de estudio de esta alga , por ello se piensa que es importante dar a conocer a los microbiólogos clínicos esta nueva posibilidad que deben añadir a la sistemática de diagnóstico cuando se encuentren con formas levaduriformes que son con las que se pueden confundir.

### ESTUDIO DEL GENERO PROTOTHECA

Las algas del género Prototheca son seres microscópicos unicelulares que se encuadran dentro de los Protistas Superiores,( EUCARIONTES), como organismos pertenecientes a las algas desprovistas de clorofila, con grandes semejanzas, por una parte con las algas del género Chlorella, del que en un principio se pensó fuesen mutantes aclorofílicas.(BEIJERINK,1904), por ejemplo C. pyrenoides y C. protothecoides, y por otra parte con los hongos.(CUADRO 1).



CUADRO 1. CLASIFICACION DE LOS PROTISTAS.

La posición taxonómica es incierta. Su morfología, multiplicación por fisión celular, posesión de algunos antígenos en común con las algas, posesión de plastídios (en algunas especies solo), y el bien conocido origen por pérdida de clorofila a partir de mutantes blancos de Chlorella spp., sugiere un origen a partir de algas, las cuales por pérdida de clorofila se han transformado en heterotróficas.

Por su forma de reproducción: asexual, se han clasificado entre las algas. La forma que se conoce es por escisión múltiple en un proceso que tienen lugar dos o más divisiones nucleares sin división celular, que da lugar a una célula madre multinucleada y por ruptura origina de dos a veinte células hijas mononucleadas. ( WEST, 1916).

Su morfología es esférica u ovoidéa, siendo su talla variable, aproximadamente de 1.6 a 16 micras de diametro, lo que hace pueda a veces confundirse con diversas formas de hongos levaduriformes no esporulados como Blastomyces dermatitidis, Criptococcus neoformans, Paracoccidioides brasiliensis, Candida spp, Rhodotorula spp, Coccidioides immitis, Rhinosporidium seeberis, Torulopsis glabrata, Thricosporum cutaneum, Gectrichum

candidum, e incluso otros organismos de tipo Protozoo como Pneumocistis carinii ya que a veces sus endosporas características no son visibles en preparaciones microscópicas de tejidos o cultivos.

## 2.2. CLASIFICACION ACTUAL.

El género Prototheca fue descrito por Kruger, aunque erróneamente lo clasificó como Hongos, ya que eran organismos unicelulares, aclorofílicos y heterotróficos. Ya en 1913, CHODAT lo clasificaba como algas y en 1916, WEST llamaba la atención sobre la manera de reproducción por endosporas, como las algas. Mas tarde, TUBAKI y SONEDA, proponen una evolución paralela a las algas del género Chlorella desde una forma principal de las clorofíceas en las que las Prototheca spp tenían grandes similitudes con los hongos aunque el parecido podía ser un simple fenómeno de "Convergencia evolutiva". Se pensó que Prototheca pudiera ser una mutante aclorofilica de Chlorella. Sin embargo el estudio de sus paredes celulares, indico que esto no era cierto. Tambien nutricionalmente se vio que existen diferencias entre ambos como los requerimientos en Tiamina y la asimilación de Nitratos. No obstante existe gran relación nutricional con Chlorella protothecoides.

En definitiva actualmente se consideran como algas unicelulares aclorofílicas pertenecientes a la División Chlorophyta, Clase Chlorofíceas y Orden de las Chlorococcales, constituyendo el Género Prototheca con sus diferentes especies.

A partir de la primera descripción de Kruger en 1984 de P. zopfii y P. moriformis, se han realizado una serie de des-

cripciones de posibles nuevas especies; así en 1930, ASHFORD et al. describen a P. portoricensis y P. portoricensis var. trispora en 1961, NEGRONI a P. ciferri, en 1959, TUBAKI y SONEDA a P. wickerhamii, en 1964, DAVIES et al. a P. sebwema, en 1959 COCKE describe a P. stagnora y en 1972 ARNOLD y AHEARN describen a P. filamenta.

También recientemente se han descrito otras especies aún no perfectamente definidas taxonómicamente como son P. hidrocarborea, P. stephiska y P. salmonis. También, aunque no aceptadas en la literatura como especies diferentes sino como sinónimas de P. zopfii, se pueden encontrar citas de P. chlorolloides y P. pastoriensis.

No obstante, actualmente, tras los estudios antigénicos de las citadas especies se tiende a considerar tres especies con identidad propia y una serie de especies que podrían considerarse sinónimas de estas, como se recoge en el CUADRO 2.

ESPECIES ACEPTADAS	ESPECIES EN ESTUDIO	ESPECIES SINONOMAS	ESPECIES NO VALIDAS
<u>P. zopfii</u>	<u>P. hidrocarborea.</u>	<u>P. moriformis</u>	<u>P. filamenta</u>
<u>P. wickerhamii</u>	<u>P. stephiska</u>	<u>P. portoricensis</u> var. <u>trispora</u>	
<u>P. stagnora</u>	<u>P. salmonis</u>	<u>P. ciferri</u>	
		<u>P. sebwema</u>	
		<u>P. ubrizsyi</u>	
		<u>P. chlorelloides</u>	
		<u>P. portoricensis</u>	

CUADRO 2. ESPECIES DE PROTOTHECA.



## 2.3. CRITERIOS DE ESTUDIO.

El diagnóstico microbiológico de laboratorio ha sido el que ha permitido describir, al confirmar la especie causal, esta nueva forma patológica humana denominada Protothecosis. Este diagnóstico puede llevarse a cabo en el momento presente mediante una serie de criterios de tipo Morfológico, Bacteriológicos simples, Bioquímicos e inmunológicos.

### 2.3.1. MORFOLOGICOS.

Son los primeros que sirven para orientar el diagnóstico y consisten en la visión microscópica de la morfología típica de este organismo, bien en cortes histológicos de las lesiones o bien en preparaciones hechas a partir de cultivos. Se han utilizado para ello diversas tinciones como Azul de Lactofenol P.A.S., Hematoxilina, Eosina, entre otras con mas o menos utilidad.

Se observan al microscopio formas levaduriformes, redondeadas u ovaladas de 1.5 a 16 micras, Gram(+), Basófilas y fluorescentes con Naranja de Acridina. No filantan ni producen artrosporas, pseudomicelio ni clamidosporas. Tampoco cápsula. No presentan reproducción por gemación. En algunas fases evolutivas puede observarse una pared con tabiques y esporas internas características denominadas ENDOSPORAS, AUTOSPORAS O APLANOSPORAS. No obstante estas formas levaduriformes, si no se observa la esporulación típica pueden fácilmente confundirse con hongos del tipo levaduriforme. Por ello sería siempre conveniente completar la identificación con otros criterios.



### 2.3.2. BACTERIOLOGICOS.

Entre ellos se tiene en cuenta su crecimiento en diferentes medios de cultivo, sólidos como Sabouraud, Agar Sangre , donde su crecimiento es fácil dando una colonia de color blanquecino o cremosa.

Otros medios de cultivos empleados son líquidos donde se observa la producción de velos o películas en superficie, así como el enturbiamiento o depósito granuloso en el fondo.

También se tienen en cuenta otros criterios simples como la Temperatura de crecimiento, ( 4, 14, 25, 30, 37, 45 °C) y la resistencia y sensibilidad a la actidiona y al cloranfenicol añadidos en el medio de cultivo.

### 2.3.3. BIOQUIMICOS.

Se utilizan como criterios diferenciales, entre otros , la asimilación de azúcares, alcoholes y compuestos nitrogenados. Requerimientos de Tiamina, Fermentación de azúcares y la Prueba de la Ursasa.

### 2.3.4. INMUNOLOGICOS.

Vienen a completar los anteriores y sirven para confirmar las especies por inmunofluorescencia directa a partir de cultivos o cortes histológicos.

Con todos estos criterios mencionados se puede llegar hoy normalmente a un diagnóstico y tipificación exactos de la especie de Prototheca causante del proceso.

Las características diferenciales de algunas especies del género *Prototheca* se recogen en el CUADRO 3 y se comparan con

	<u>P. wicker-</u> <u>hamii</u>	<u>P.zopfii</u>	<u>Cándida</u> <u>albicans</u>	<u>C. krusei</u>
37 ° C	+	+	+	+
medio liquido	-	-	-	+
filamentacion	-	-	+	-
pseudomicelio	-	-	+	+
capsula	=	-	-	-
clamidosporas	=	-	+	-
artrosporas	=	-	-	-
endosporas	+	+	-	-
glucosa	+	+	+	+
maltosa	=	-	+	-
sacarosa	-	-	+	-
lactosa	-	-	=	-
galactosa	+	+	+	-
rafinosa	=	-	-	-
trehalosa	+	-	+	-
melobiosa	-	-	-	-
inositol	-	-	=	-
actidiona	-	-	+	-
urea	=	?	=	-

CUADRO 3. DIAGNOSTICO DE LABORATORIO DE LAS PROTOTHECA.

Las especies mencionadas se comparan con algunas levaduras aisladas.

## 2.4. LA PROTOTHECOSIS.

### 2.4.1. DEFINICION.

Se entiende por PROTOTHECOSIS una enfermedad de tipo verrucoso cutáneo o diseminado, causado por especies del citado género. Se incluye dentro de las MICOSIS, pero atendiendo a que el agente etiológico es un mutante aclorofílico de algas del género Chlorella, constituyendo el género Prototheca.

### 2.4.2. ETIOLOGIA.

La Protothecosis está causada por P. zopfii, P.wickerhamii y otras especies( posiblemente P. stagnora ). Estas han sido aisladas de verrucosidades cutáneas o de lesiones progresivas en el Hombre(en algunos casos asociadas a lesiones linfáticas), en la Mastitis bovina y en enfermedades diseminadas en el perro. P.wickerhamii ha sido aislada de lesiones dérmicas y linfáticas en el ciervo. Se puede anticipar que esta enfermedad es poco conocida y que el espectro clínico y el rango geográfico está en expansión. ( 5).

### 2.4.3. REVISION HISTORICA.

La Protothecosis supone una relación entre la Medicina, la Biología y la Veterinaria, recientemente conocida.

ASHFORD et al. aislaron P. zopfii en casos de "sprue" tropical, donde probablemente no desempeñaba ningun papel etiológico.

Con los aislamientos de P. zopfii en la leche de vaca con

Mas tis realizados por LERCHE (1952) y AINSWORTH et al.(1955) y el informe de una lesión verrucosa extensiva en los pies de un paciente, dado por DAVIES et al.(1964), la patogenicidad ha sido reconocida y ha merecido su atención.

Microbiólogos que trabajan en cultivos de algas verdes están familiarizados con el origen de mutantes aclorofílicos de Chlorella spp. Esta mutación puede ser inducida por exposición a rayos ultravioleta,(BUTLER,1954) o con el uso de estreptomina,(SCHWIMMER,1955).

#### 2.4.4. TIPOS CLINICOS.

Especies de Prototheca han sido aisladas de patata en descomposición, heces, aguas y vertidos fecales y suciedad en general y no es de extrañar que se localice en el tracto intestinal donde no desempeña ningún papel etiológico.

La invasión actual de tejidos cubre un amplio espectro de tipos clínicos e histopatológicos, muchos de los cuales han sido mencionados en el transcurso de la historia de la Protothecosis que se manifiesta en la Piel, Nodulos Linfáticos, Ojos, Riñón, Músculo y glándula mamaria bobina.

#### 2.4.5. ALGOLOGIA

##### 2.4.5.1. PROTOTHECA ZOPIII

Se desarrolla en Agar Glucosa-Neopeptona y produce una colonia blanca semejante a una colonia levaduriforme con una superficie blanca mate.

Su crecimiento se inhibe con Cicloheximida en una concentración de 0.5mg/ml. Como otras especies de *Prototheca*, requiere Diamina. Asimila los Azucares: Dextrosa, Galactosa y Levulosa y el Alcohol Etanol.

Las células de *P. zopfii* son esféricas o elípticas de 22 a 30 X 17 a 24 micras de tamaño. En preparaciones fijadas y teñidas el citoplasma es reticulado y multinucleado. La multipli- cación ocurre por división nuclear seguida por el reparto de citoplasma en 2 a 8 ó más células mononucleadas. Pueden haber dos o más divisiones nucleares sucesivas antes de la división del citoplasma (FIGURA 1), o bien esta división citoplasmática puede seguir a la primera división nuclear y las dos protosporas pueden dividirse después, cuando las células hijas rompen la pared de la célula madre, el esporangio. (FIGURA 2).

#### 2.4.5.2. PROTOTHECA WICKERHAMII

Se desarrolla difícilmente por debajo de los 20 °C y es inhibida a 38 °C siendo su Temperatura Optima de 30 a 32 °C. Produce una colonia húmeda de color crema. Fermenta Glucosa con producción de ácido y asimila Galactosa, Manosa, Glucosa, Etanol y Glicerol. Su crecimiento es inhibido por un Ph superior a 7.

Es mas pequeña que *P. zopfii*, con células esféricas o elípticas de 2 a 11 micras de diametro. La división nuclear es seguida por la división citoplasmática que es irregularmente progresiva. Se estimó que el mayor esporangio pudiera contener alrededor de 50 esporangiosporas (FIGURA 3).

## 3. MATERIALES Y METODOS.

### 3.1. DESCRIPCION DE LA ZONA DE MUESTREO

La PLAYA DEL HOMBRE, situada en el Término Municipal de Telde, tiene su franja litoral orientada hacia el NE de la isla de Gran Canaria.(FIGURA 4). Se encuentra sometida al vertido directo o indirecto de aguas residuales de origen doméstico. Las aguas residuales procedentes de los vertidos generados por las urbanizaciones existentes en la zona, así como las procedentes de la central depuradora de Hoya del Pczo, localizada al norte de la playa, desemboca en la zona marítima del litoral trayendo como consecuencia una notable degradación ecológica, desequilibrios naturales y un alto deterioro estético, por lo que tiene un interés considerable estudiar y prevenir los riesgos sanitarios potenciales asociados a este tipo de procesos.

El mar, al recibir esta descarga de aguas residuales, se convierte en un caldo de cultivo de una amplia gama de microorganismos que pueden significar un riesgo para la salud de los usuarios que disfruten de estas aguas para el baño y recreo y que además están expuestos a los aerosoles marinos de la zona provocados por el continuo viento alisio de dirección NE.

En este trabajo no se estudian indicadores de contaminación de origen fecal, pero sí se estudian determinados microorganismos que, aunque no estén considerados en los Programas de Vigilancia de Calidad Sanitaria de las Playas, están íntimamente asociados a procesos de degradación ecológica y biológica por aguas residuales. (10).



El riesgo sanitario asociado a las descargas de aguas fecales es muy elevado, a su vez, el agua de mar y la arena de la playa se transforman, de este modo, en una reserva de microorganismos capaces de producir diversas enfermedades mencionadas en trabajos anteriores.(2).

La Playa del Hombre como se recoge en la figura 4 se encuentra limitada al Sur por la Punta de Comisaría y al Norte por la Playa de Hoya del Pozo con la que conforma una misma entidad geológica.

La Playa del Hombre es lugar de asentamiento de una numerosa población que vive en la urbanización que rodea a la playa a partir del mismo nivel costero.

Por otra parte, en la misma figura se observa la cantidad y disposición de los vertidos que se realizan en la zona litoral comprendida entre Punta de la Mareta y Punta Comisaría.

La situación geográfica de la Playa del Hombre favorece por su disposición a que la carga microbiológica contaminante que proviene de los vertidos, se mantenga en el medio marino litoral al no existir una renovación eficaz de la masa de agua que ocupa la playa. Este efecto se ve favorecido por la dinámica marina de la zona y por los vientos de componente NE.

### 3.2. OBTENCION DE LAS MUESTRAS.

Para la selección de las estaciones de recogida de muestras, el criterio general es situarlas en las zonas mas frecuentadas por los bañistas.

La obtención de las muestras se ha realizado con una periodicidad aproximadamente quincenal para obtener datos esta-



istóticamente válidos.

Se ha designado un transecto perpendicular a la playa en su zona central que incluye puntos de recogida de muestras de arena seca, arena húmeda, y agua de mar. Como se observa en la FIGURA 5, el punto A se localiza a tres metros por encima del nivel máximo de la Pleamar y nos proporciona la muestra de arena seca. El punto B, se sitúa en la franja intermareal definida como aquella que es bañada por el agua durante la oscilación diaria de las mareas, nos proporciona la muestra de arena húmeda. Y finalmente el punto C situado en el agua de la playa a una profundidad de 30 a 50 cm., nos proporciona la muestra de agua de mar.

Se han tomado las precauciones necesarias que aseguren el valor obtenido de las muestras y evitar posibles contaminaciones accidentales. El uso de frascos de vidrio con tapa de rosca hermética previamente esterilizados y el traslado al laboratorio del material procedente de los muestreos, que dadas sus cercanías, no precisa de un traslado de las muestras en cajas isotermas a baja temperatura.

#### 5.2.1. ARENA SECA.

Para la obtención de la muestra de arena seca, se utilizó al igual que en los otros puntos, frascos de vidrio de boca ancha y rosca hermética, con un volumen de 125ml.

Debido a la poca bibliografía existente respecto a las técnicas de muestreo de las arenas de las playas de uso recreativo y siguiendo los criterios de BOIRON et al.(2),(3), se recoge la muestra de arena entre 5 y 15 cm. de profundidad, u

utilizando espátula estéril y recogiendo cantidades de 50 gramos aproximadamente.

### 3.2.2. ARENA HUMEDA

Para la obtención de las 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 introduce en el frasco correspondiente para ser analizada posteriormente

### 3.2.3. AGUA DE MAR

Se recogen 100 ml. de agua de mar poco profunda, (30-50 cm) abriendo y cerrando el frasco de vidrio debajo del agua y se transporta al laboratorio.

### 3.3. AISLAMIENTO.

Se han descrito algunos medios de cultivo para el aislamiento de algas del género Prototheca. Entre ellos, PORE(1973) proporciona un medio selectivo para el aislamiento de Prototheca, denominado Medio P.I.M. En este trabajo y por razones técnicas se ha utilizado el medio de cultivo Sabouraud Modificado(DIFCO), enriquecido con cloranfenicol al 0.5 por mil, estando recomendado para el cultivo y crecimiento de hongos y otros microorganismos, en particular aquellos que están asociados a infecciones cutáneas. La adición de antibióticos a

medios ácidos así como a medios neutros ha demostrado ser sa tisfactorio para el aislamiento de microorganismos resistentes (hongos levaduriformes, algas, etc.).

#### 3.3.1. AGUA DE MAR.

Para el aislamiento de algas del género Prototheca y de hongos levaduriformes procedentes del agua de mar, se diluyen 10 ml. de agua de la muestra en 50 ml. de suero fisiológico estéril, agitándose vigorosamente durante 30'.

Posteriormente se filtra el contenido a través de una mem brana filtrante de 0.45 micras de diametro de poro (MILLIPORE). Esta operación se realiza por triplicado. Una vez filtradas las cantidades, los filtros se siembran en placas de petri de 85mm. de diametro, conteniendo 10 ml. de Agar Sabouraud Modificado (DIFCO.), añadido de Cloranfenicol a una concentración de 0.5 gr/L. Las placas se incuban a Temperatura ambiente de 24-27 °C durante 3, 5, 6 ó 7 días hasta que el desarrollo de las colonias sea apreciable. En este momento se resiembran nuevamen te por triplicado hasta garantizar la presencia de una sola ce pa por placa, que es conservada en tubos de tapa hermética con agar de Sabouraud inclinado.

#### 3.3.2. ARENAS.

Se pesa esterilmente 1 gramo de arena a la que se añade 10 ml. de agua destilada estéril a la que se le ha incorporado Cloranfenicol al 0.1 gr/L. y TWEEN-80 a una concentración

de 0.2 gr/L. Se agita vigorosamente durante 1'. Esta operación se realiza por triplicado. Series de 0.2 ml. de sobrenadante son sembradas en placas de petri, por triplicado a su vez con el medio ya descrito.

Las placas así obtenidas se cultivan a Temperatura ambiente, hasta el resurgimiento de las colonias. Estas son resemebradas hasta asegurarse de la presencia de una sola cepa por placa.

En el caso de que hubiese un desarrollo excesivo en las placas iniciales, se procede entonces a la dilución de las muestras originales hasta cantidades de  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ , etc., multiplicando los resultados por los factores de dilución respectivos.

#### 3.4. DETERMINACION DE LAS ALGAS.

##### 3.4.1. IDENTIFICACION MORFOLOGICA.

Como ya se dijo anteriormente, el diagnóstico microbiológico de laboratorio permite identificar a especies del género Prototheca.

En primer lugar, se atiende al criterio macroscópico de morfología de la colonia, color, aspecto, olor, diametro de la colonia a los 7 días, consistencia, textura, brillo, forma del borde, etc.

Posteriormente se un reconocimiento microscópico de la morfología de la célula( acicular, cilíndrica, navicular, esférica, ovoidea, etc.).

Para la manipulación de este material biológico, se ex-

treman las precauciones, utilizando Lactofenol Azul de Amman como fijador en las preparaciones. La eliminación del material después de su estudio, se hace por inmersión en hipoclorito sódico durante 24-48 horas antes de ser autoclavado a 121 °C durante 30 minutos.

#### 3.4.2. IDENTIFICACION BACTERIOLOGICA.

En este aspecto se consideran el desarrollo de la colonia en el medio de cultivo, Ph óptimo, Temperatura óptima de desarrollo, resistencia a ciertos antibioticos añadidos al medio de cultivo, así como tinciones( GRAM).

#### 3.4.3. IDENTIFICACION BIOQUIMICA.

La identificación bioquímica de las algas del género Prototheca se lleva a cabo utilizando el sistema de identificación API 20 C AUX que ha sido desarrollado para proporcionar una identificación completa de hongos levaduriformes que se encuentran en el campo clínico en 24, 48 ó 72 horas.

El fundamento del sistema API 20 C AUX consiste en una galería de 20 cúpulas y un medio de cultivo para la identificación de las levaduras mas frecuentes en clínica médica así como las algas del género Prototheca.

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 una concentración celular correspondiente al Nº 2 de la escala de McFarland. ( $10^{-4}$  células/ml.).

A partir de esta suspensión de células, se añaden unas gotas al medio API 20 C, se homogeniza y se inoculan las cápsulas que contienen cantidades suficientes de azúcares para valorar la reacción. Posteriormente se incubaba 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.

#### 4. RESULTADOS.

1. El conjunto de pruebas expuestas anteriormente permite la determinación de las especies en la totalidad de las cepas estudiadas.

Los resultados para el aislamiento en arena seca, arena húmeda y agua de mar se encuentran en la TABLA Nº 1. En total se han aislado 16 cepas del género Prototheca, de las 42 muestras obtenidas en la playa, correspondiendo 5 cepas a la arena húmeda y 13 al agua de mar, mientras que todos los resultados fueron negativos para la arena seca.

Se identificaron las 16 cepas aisladas siguiendo los criterios antes mencionados, observándose una mayor diversidad en el agua de mar, correspondiendo 6 a Prototheca wickerhamii 4 a Prototheca zopfii y tres cepas de Prototheca stagnora. En arena húmeda se identificaron tres de Prototheca wickerhamii y ninguna en arena seca.

La especie P. wickerhamii es la especie mayoritaria pues representa el 56 % del total de algas aisladas, y es precisa-



samente la mas patógena para el Hombre. Tambien es interesante destacar la presencia de P. stagnora, especie muy poco corriente de la cual se conoce muy poco.

2. Al analizar la arena de la playa se desprende la existencia de Prototheca sp. en arena húmeda y no en arena seca. Este hecho sugiere que las arenas húmedas, al estar bañadas por el agua de mar, con un elevado número de microorganismos de origen fecal, retienen parte de la flora microbiana durante el periodo comprendido entre la primera pleamar y la segunda pleamar durante el ciclo diario de las mareas.

3. Se ha analizado a la vez cuantitativamente la presencia de Hongos levaduriformes de interés clínico en los tres puntos de muestreo. Los valores obtenidos a lo largo de la temporada de muestreo se recogen en la FIGURA 6 , y FIGURA 7 .

En ella se puede observar cierta correlación en cuanto a la presencia de este tipo de organismos en los biotopos estudiados. Así, para los Hongos Superiores de Micelio Definido ( presencia de hifas, septadas o no ), hay una estrecha relación cuantitativa-temporal en arena seca, arena húmeda y agua de mar, no siendo así para los Hongos de tipo Levaduriforme. En estos últimos aparece una relación directa entre los medios húmedos, mientras que en ambiente seco la proporción es pobre y la fluctuación temporal, escasa.

De todos estos resultados se deduce la distribución de este tipo de algas en aguas de mar y arenas de playas, sometidas al vertido directo de aguas residuales. Dada la abundante



presencia de este tipo de microorganismos en este medio, habrá que tenerlas en cuenta en procesos clínicos como un agente más en el diagnóstico diferencial de los Hongos Levaduriformes con los que pueden ser fácilmente confundidos.

4. Teniendo en cuenta los volúmenes de agua filtrados y las cantidades de arena pesadas, si expresáramos los resultados términos de U.F.C. (Unidades Formadoras de Colonias) por volumen filtrado o peso podemos cuantificar la abundancia de microorganismos estudiados en los distintos sitios del transecto. Así, del total de cepas aisladas, tanto la arena húmeda como el agua tienen valores similares de abundancia, mientras que estos son claramente inferiores en la arena seca. Pero no ocurre así en los hongos de micelio definido que resultan ser cosmopolitas pues se obtienen valores similares para los tres biotopos del transecto.

##### 5. DISCUSION.

Teniendo en cuenta las limitaciones que a que está sometido el desarrollo de este trabajo tanto en el espacio como en el tiempo, no es posible obtener conclusiones globales respecto a la existencia de una flora ficológica y una flora micológica patógena para el Ser humano, pero puntualmente conocemos la abundancia y diversidad de las especies identificadas.

La presencia de géneros como Cándida y Prototheca nos conduce a pensar que el origen de estas especies no es propiamente

te marino, sino producto de los vertidos de aguas residuales en la zona próxima a la playa. Debido a que la capacidad de supervivencia de los microorganismos es mayor que la capacidad depuradora y antibiótica del agua de mar, se se convierte en un reservorio y vehículo de dispersión de estos microorganismos que, al llegar a la playa, pueden retornar al usuario de la misma, con el consiguiente riesgo para la salud.

Por otra parte , todas las especies aisladas están asociadas a algún caracter patógeno para el Hombre, tanto las correspondientes al género Prototheca, como a los Hongos Levaduriformes encontrados.(identificados en trabajos anteriores).

## 6. CONCLUSIONES

1. Se ha logrado aislar tres especies de un género de algas consideradas el agente etiológico de la Protothecosis de un medio litoral sometido al influjo de vertidos fecales.
2. El ambiente húmedo es el mas favorable para la supervivencia de estas especies.
3. Los valores obtenidos, aunque no se dispone de una escala de comparación se suponen altos o muy altos, al encontrarse Playa del Hombre sometida a unos niveles de contaminación excepcionalmente altos
4. El riesgo sanitario al que se exponen los visitantes y u-

suaricos de la playa es evidente.

## 7. RECOMENDACIONES.

1. Se desaconseja el uso de la playa para los bañistas y paseantes.

2. Se recomienda la rápida intervención de las entidades y autoridades competentes para buscar una solución a este contínuo y progresivo deterioro del medio ambiente que produce un alto desequilibrio ecológico y 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.

BIBLIOGRAFIA.

1. APHA, AWWA, WPCF. STANDARD METHODS FOR EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER. 16<sup>th</sup> EDITION. 1268pp.
2. BOIRON, P. AGIS F. ETUDE PRELIMINAIRE DE LA FLORE LEVURIFORME D'INTERET MEDICALE OBSERVEE EN MILIEU MARIN LITTORAL EN GUADALOUPE. BULL.SOC.PATH.EX 75. 1982 (272-278).
3. BOIRON P. AGIS et al. ETUDE DE LA FLORE LEVURIFORME D'INTERET MEDICALE DE LA PLAGE DE SAINTE ANNE EN GUADALOUPE. BULL.SOC. PATH. EX 76. 1983.(351-356).
4. BRISOU, J.F. et DENIS, F.A. HIGIENE DE L'ENVIRONNEMENT. MASSON. PARIS. 1978. 219 pp.
5. CASAL, M. CONTRIBUCION AL ESTUDIO Y DIAGNOSTICO MICROBIOLOGICO DE LAS ALGAS PATOGENAS PARA EL HOMBRE DEL GENERO PROTOTHECA. LABORATORIO Vol. 67, Nº 401, MAYO 1979.(421-429)
6. CASAL, M. et al. CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE LA PRESENCIA EN ESPAÑA DE ALGAS POTENCIALMENTE PATOGENAS PARA EL HOMBRE DEL GENERO PROTOTHECA. ASPECTOS DIAGNOSTICOS Y DE RESISTENCIA. LABORATORIO, 12-1981. Nº 452.
7. CHESTER W. EMMONS, et al. MEDICAL MYCOLOGY. Cap. 33. 3ª Ed.
8. DAVIS R., SPENCER, H. A CASE OF HUMAN PROTOTHECOSIS. TRANS. ROY. SOC. TROP. MED. HYG. 58.(448-451).

9. LASKIN, A. LECHEVALIER, H. CRC HANDBOOK OF MICROBIOLOGY  
2ª Ed. Vol. 2. CRC INC. PRESS. 1978.
  
10. O'SHANAHAN, L. VALLE, R. LA CONTAMINACION POR AGUAS RESI-  
DUALES EN LA PLAYA DEL HOMBRE- TELDE, GRAN CANARIA. EXMO.  
CABILDO INSULAR DE GRAN CANARIA. Reg. Ent. 20-06-88.
  
11. VALLE, R. ESTUDIO DE LA FLORA LEVADURIFORME DE INTERES ME  
DICO DE LA PLAYA DEL HOMBRE EN EL MUNICIPIO DE TELDE-GRAN  
CANARIA. EXMO. CABILDO INSULAR DE GRAN CANARIA. Reg Ent.  
20-06-88.



FIGURA 1. P. zopfii mostrando el citoplasma reticulado previo a la rotura de la pared de la célula madre.



FIGURA 2. P. zopfii mostrando varios estados de reproducción ( C: división citoplasmática posterior a la primera división nuclear. D: citoplasma reticulado) ( x 1575).



FIGURA 3. P. wickerhamii, de tamaño inferior que P. zopfii  
( x 1575).( sección de tejido de una lesión de  
riñón en el perro. Dr Kovatch, A.F.I. of pathology).



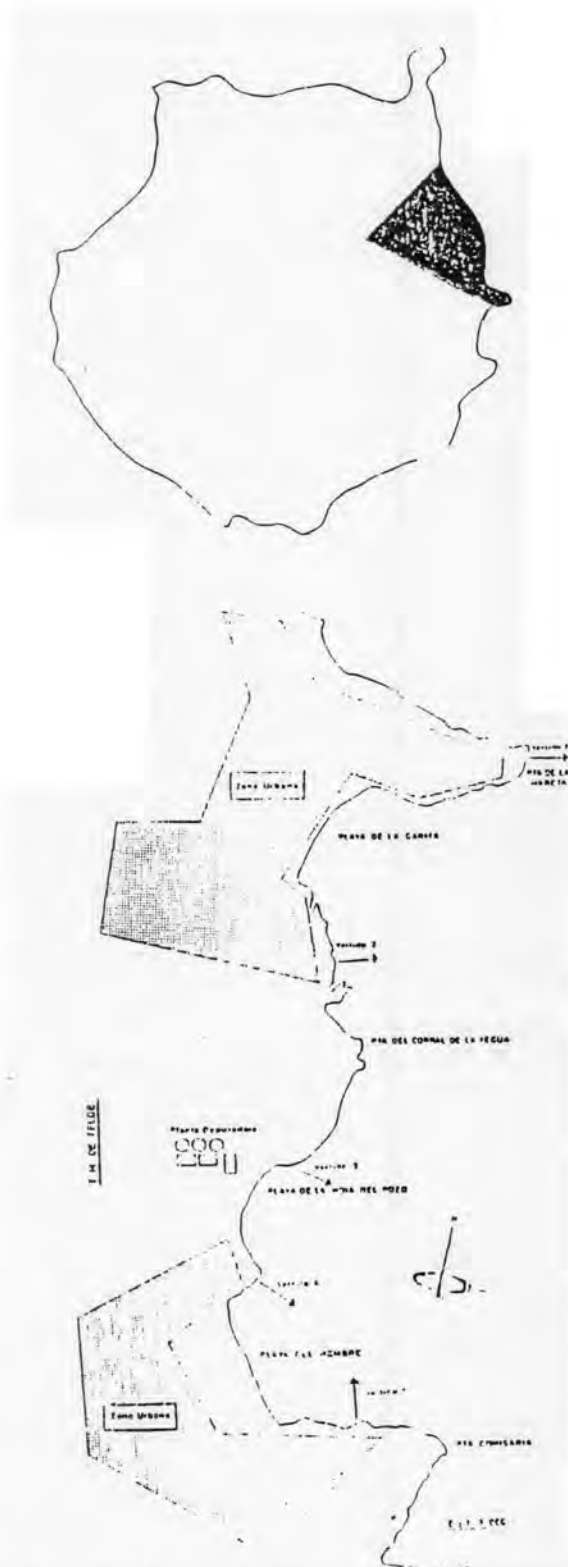


FIGURA 4. En la parte superior se representa la localización del Término Municipal de Telde en la Isla de Gran Canaria. En la parte inferior se detalla el enclave de la Playa del Hombre así como la distribución de los vertidos en la zona.



FIGURA 5. REPRESENTACION DEL TRANSECTO DEL CUAL SE  
EXTRAEN LAS MUESTRAS( A,B,C ).

GENERO	ESPECIE	NºCol	FRECUENCIA	A.S.	A.H.	AGUA
PROTOTHECA	<u>P. wickerhamii</u>	9	9 / 16	0	3	6
PROTOTHECA	<u>P. zopfii</u>	4	4 / 16	0	0	4
PROTOTHECA	<u>P. stagnora</u>	3	3 / 16	0	0	3
TOTAL:		16	16 / 16	0	3	13

TABLA 1. NUMERO DE COLONIAS DE LAS DISTINTAS ESPECIES AISLADAS EN LOS DISTINTOS BIOTOPOS ESTUDIADOS.

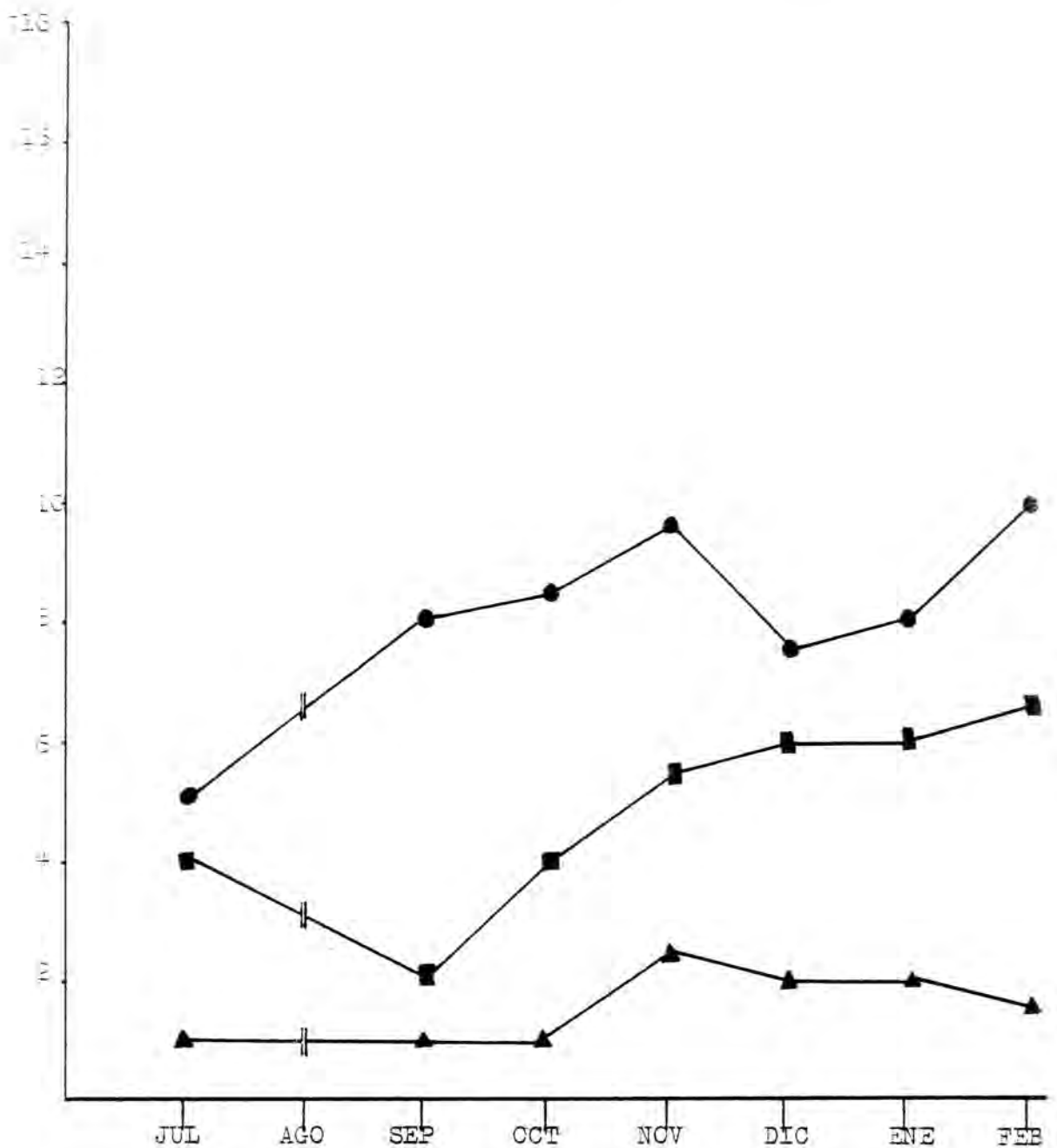


FIGURA 6. FLUCTUACION DE LA ABUNDANCIA DE HONGOS LEVADURIFORMES DURANTE EL PERIODO DE ESTUDIO JULIO-88 y FEBRERO-89 .(LOS VALORES ESTAN EXPRESADOS EN U.F.C. 100 ml. EN AGUA Y EN U.F.C. 100 grs. PARA LA ARENA).

- ▲ : ARENA SECA.( U.F.C./1 gr.).
- : ARENA HUMEDA.( U.F.C./1 gr.).
- : AGUA DE MAR. ( U.F.C./10 gr.).

NOTA : NO HAY DATOS CORRESPONDIENTES AL MES DE AGOSTO.

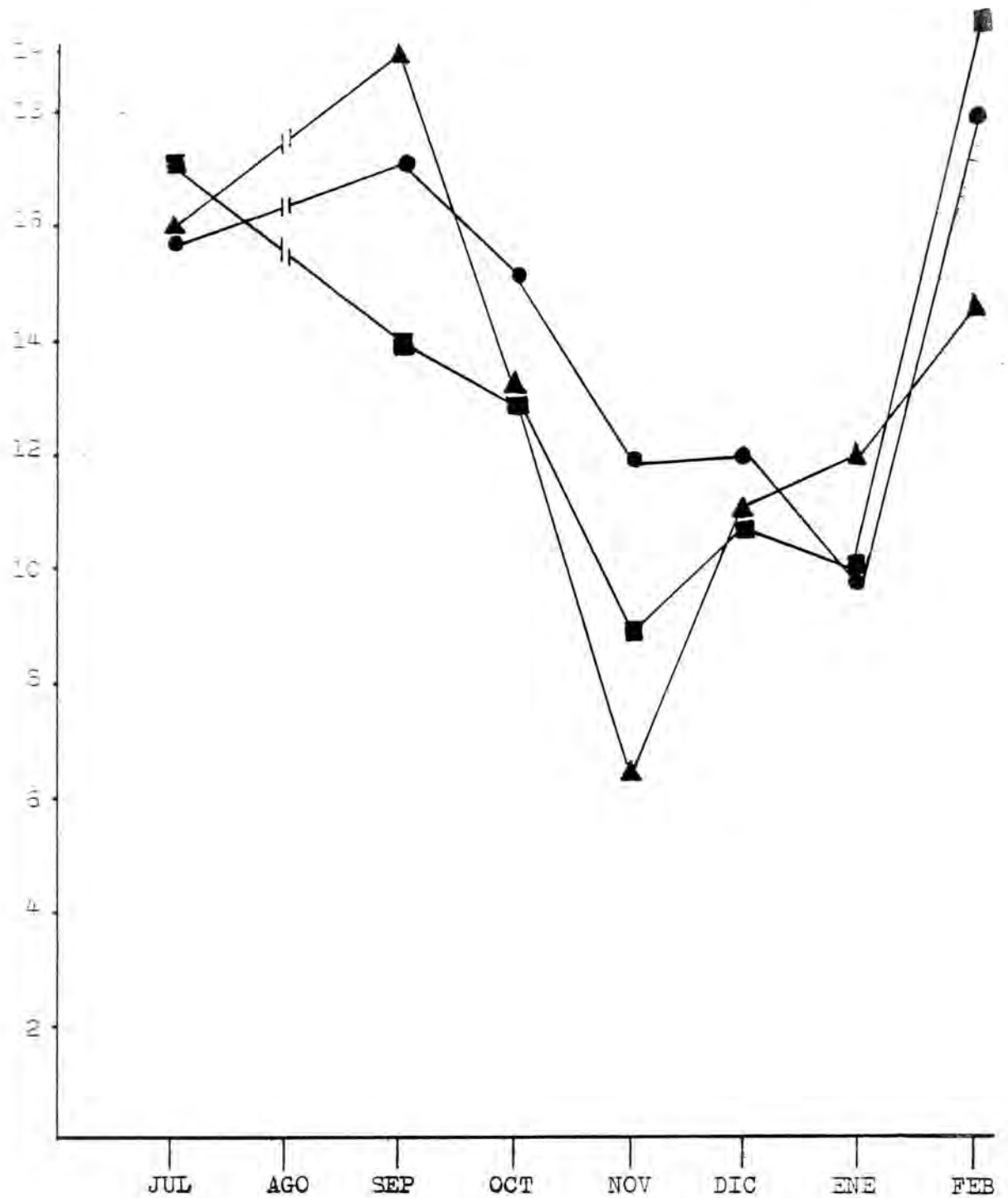


FIGURA 7. FLUCTUACION OBSERVADA EN LAS POBLACIONES DE HONGOS DE MICELIO DEFINIDO DURANTE EL PERIODO DE ESTUDIO CITADO. SE RECOGEN VALORES EXPRESADOS EN U.F.C. 100 ml. PARA EL AGUA DE MAR Y EN U.F.C. 100 gr. PARA LA ARENA.

- ▲ : ARENA SECA.(U.F.C./1 gr.).
- : ARENA HUMEDA.(U.F.C./1 gr.).
- : AGUA DE MAR.(U.F.C./10 ml.).