

LEVADURAS EN AGUAS COSTERAS DEL MAR MENOR Y DESEMBOCADURA DEL RIO SEGURA

F. Marín, F. Torrella y M. Gacto *

RESUMEN

Como parte de un trabajo más amplio sobre contaminación microbiana en áreas marinas, se ha llevado a cabo un estudio de aislamiento y recuento de levaduras en diversos puntos del Mar Menor y desembocadura del río Segura. El estudio ha abarcado, entre otros aspectos, la puesta a punto de medios de cultivo adecuados para el aislamiento directo de levaduras sin interferencia por contaminación bacteriana o crecimiento de hongos filamentosos.

En los muestreos de las zonas indicadas se ha analizado la variación topográfica y estacional de las poblaciones de levaduras. Los resultados destacan el aislamiento de **Candida albicans** en varios puntos de muestreo y una mayor abundancia relativa de levaduras no patógenas en sedimentos en relación a los niveles detectados en aguas libres.

Por otra parte se han realizado estudios de laboratorio sobre supervivencia simulando las condiciones del medio marino y determinando la influencia de algunos factores fisicoquímicos en el crecimiento y viabilidad de las levaduras. En este sentido, se ha utilizado **C. utilis** como modelo representativo de levadura saprofítica y **C. albicans** como modelo de levadura potencialmente patógena. Los resultados obtenidos revelan una escasa viabilidad de ambos tipos de levaduras cuando se someten a condiciones análogas a las existentes en el medio marino.

ABSTRACT

Yeasts in coastal waters of the Mar Menor lagoon and the mouth of the Segura River (SE Spain)

Information on marine yeasts and their significance in polluted waters is scarce. In this paper we report the results of isolations of yeasts and molds found in marine waters from the Mar Menor (Southeastern Spain) and the mouth of the Segura river. Compositional modifications of various culture media and a critical evaluation of the results obtained are also presented. Mold colonies are significantly reduced in the modified media so that direct yeast counting becomes improved.

Yeast counts, including red species, have been significantly higher in sediments as compared to free waters. **Candida albicans** was detected in relatively high numbers in the most polluted sites. The survival ability in natural waters of two yeasts, **C. utilis** and **C. albicans** was investigated. The results show that both yeasts present a high death rate in marine and brackish waters, only 1-0'01% remaining viable after 25 days in sea water.

* Departamento de Microbiología. Facultad de Biología. Universidad de Murcia.

INTRODUCCION

En los últimos años, han aparecido una serie de publicaciones que revelan un gran interés hacia la Micología Marina en tres aspectos: ecología de los hongos en el medio marino, levaduras indicadoras de contaminación y levaduras patógenas.

Durante mucho tiempo se puso en duda la existencia de hongos marinos y por tanto su posible papel ecológico. Hoy día se conocen diversas especies de hongos marinos autóctonos. Algunos son hongos zoosporados (7, 14), comunes en aguas litorales contaminadas donde compiten con bacterias marinas. Por otra parte, los hongos pueden formar parte importante de los ciclos de tiamina y vitamina B₁₂ en el océano (7).

También se han encontrado Ficomycetos, Ascomycetos y Deuteromicetos como epífitos sobre algas superiores y macrofitas (12, 9, 15), así como sobre maderas sumergidas (11, 9), y otros sustratos (13). Sin embargo, el mayor número de publicaciones corresponden a levaduras marinas aisladas en aguas y sedimentos de zonas alejadas a nuestro entorno geográfico. Estos trabajos tienen una orientación ecológica y taxonómica, según se recoge en la revisión de VAN UDEN y FELL (20). Investigaciones más recientes se dirigen hacia la utilización de los recursos de levaduras totales como indicadores de contaminación del medio marino o de estuarios (8).

La presencia de hongos patógenos en el medio marino también a sido estudiada. Así, se ha descrito la presencia de *Candida albicans* (3), *Cryptococcus neoformas* (21) y otras levaduras potencialmente patógenas pertenecientes al género *Rhodotorula* (8). Aunque se dispone de pocos datos acerca de la presencia de hongos filamentosos patógenos en dicho medio, son bien conocidas sin embargo las habituales epidemias estivales de origen fúngico, que afectan a la piel, causadas fundamentalmente por dermatofitos. HAGLER y MENDOÇA-HAGLER (8) han descrito el aislamiento de *Trichosporon cutaneum* en aguas de estuario contaminadas, pero la incidencia de estos organismos en aguas ma-

rinas parece carecer de significación. Se ha propuesto que el agua de mar no es el reservorio de estos organismos sino hombres y animales que transmiten la infección por contacto directo o por fómites e incluso ocasionalmente por la arena de las playas.

Por lo que respecta a España, no se conocen datos acerca de hongos aislados en aguas costeras. Esto, unido a la particularidad de la elevada temperatura de las aguas del Mediterráneo y Mar Menor así como la alta salinidad de este último, nos ha llevado a la realización del presente estudio.

Uno de los objetivos propuestos, ha sido el recuento de hongos filamentosos y levaduras, tanto saprofitos como patógenos, en aguas del Mar Menor y desembocadura del río Segura. Dadas las dificultades que hemos encontrado para el recuento de levaduras en estas aguas, debido a la invasión de las placas por hongos filamentosos, hemos desarrollado nuevas técnicas de cultivo. Por último se ha estudiado la influencia de las condiciones ambientales sobre cepas representativas de levadura de colección en modelos experimentales de laboratorio.

MATERIALES Y METODOS

AISLAMIENTO Y RECUENTO

A) Zonas de estudio y técnicas de muestreo

En el presente trabajo se han muestreado dos áreas de la Costa Mediterránea de la provincia de Murcia, desembocadura del río Segura y Mar Menor, en un período comprendido entre Septiembre de 1982 y Julio de 1983. En la desembocadura del Segura se tomaron puntos de muestreo (estaciones G₁ a G₈, Fig. 1). En el Mar Menor, se eligieron 7 estaciones de muestreo (P₁ a P₇, Fig. 3).

Se tomaron muestras de agua superficial (10 a 500 ml), que se sometieron a filtración cuantitativa sobre filtros de membrana de 0'45 μ m de tamaño de poro (Sartorius). Los filtros se colocaron sobre medios de cultivo en placas de Petri. Las

muestras de sedimentos (15 a 20 g) se tomaron en aguas costeras de 20 a 50 cm de profundidad, se diluyeron en agua marina artificial estéril y tras agitación se dejaron sedimentar durante 15 segundos. El sobrenadante resultante fue sometido al mismo proceso de filtración y siembra que las muestras de aguas.

B) Medios y condiciones de cultivo

Se han utilizado los siguientes medios de cultivo:

– Medio Sabouraud salino.

El medio adaptado de HAGLER y MENDOÇA-HAGLER (8) para levaduras y hongos filamentosos saprofitos marinos, presentaba la siguiente composición: glucosa 20 g; peptona 10 g; extracto de levadura 5 g; agar-agar 20 g; ClNa 12 g; ClK 0'35 g; Cl₂Mg .6 H₂O 2'65 g; SO₄ Mg. 7 H₂O 3'5 g; cloramfenicol 1000 mg; agua destilada 1000 ml. pH 4'5.

El medio se esterilizó en autoclave a vapor fluente durante 15' a 100°C y se vertió en placas Petri. Las placas inoculadas fueron incubadas a 20°C durante 2 a 3 días, realizándose recuentos de colonias de levaduras totales, levaduras rojas y hongos filamentosos (mohos). Tras este período, el crecimiento invasivo de mohos impidió el recuento de levaduras.

– Medio para *Candida albicans*

Se utilizó el medio de Buck y Bubucis (3). La incubación se realizó a 37°C durante 48 h. La confirmación de colonias marrón oscuro como pertenecientes a *C. albicans* fue realizada mediante la prueba de filamentación en suero de conejo (17).

ENSAYO DE MEDIOS DE CULTIVO MODIFICADOS

Se ha realizado un estudio crítico de los medios más adecuados para el recuento de levaduras. Para ello se modificó la composición del medio Sabouraud salino, adicionando Rosa de Bengala (R.B.) a concentra-

ciones de 0'2 mg/ml y 1 mg/ml, sin cambiar las condiciones de incubación (20°C, 2-3 días). También se ensayó la incubación anaerobia (sistema Gas-Pak) a 20°C durante 15 días.

ESTUDIOS DE SUPERVIVENCIA

A) Cepas utilizadas

Se ha empleado *Candida utilis* CECT 1061 como representante de levadura saprofitica y *C. albicans* NCPF 3153 como representante de levadura potencialmente patógena.

B) Preparación de inóculos

C. utilis, fue cultivada en medio Winge líquido (0'2% de extracto de levadura y 1% de glucosa en agua destilada) e incubada a 30°C con agitación, durante 48 h. Se hicieron recuentos en cámara de Neubauer y medidas absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro B & L Spectronic 20. La absorbancia de la muestra se expresó multiplicando el factor de dilución de la muestra por el valor de absorbancia determinada entre valores de 0'1 a 0'3. Para las pruebas de supervivencia, las aguas marinas fueron inoculadas con una misma cantidad de inóculo en cada experimento para dar una concentración celular inicial de 5×10⁶/ml en el matraz de cultivo. El inóculo de *C. albicans* se preparó y ajustó de forma similar, pero utilizando un medio líquido a base de infusión de cerebro y corazón (BHI de Oxoid, 37 g/l), incubado a 37°C, como iniciador.

C) Medios de cultivo y aguas

Se emplearon los siguientes medios de cultivo y aguas salinas y salobres:

– Agua marina artificial (AMA)

ClNa 24 g; ClK 0'7 g; Cl₂Mg . 6H₂O 5'3 g; SO₄Mg . 7H₂O 7 g; agua destilada hasta 1000 ml. Después de disolver, se ajustó el pH a 8'2 y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

– Aguas naturales

Se utilizó agua salobre de reciente recogida y con elevado grado de contaminación procedente de la estación G₀ de la desembocadura del río Segura. Asimismo se utilizó agua marina de contaminación media, obtenida en la estación P₄ del Mar Menor. Estas aguas fueron directamente utilizadas sin tratamiento alguno o, alternativamente, se esterilizaron por filtración sobre membranas Sartorius, de 0'45 μm de tamaño de poro, en los casos que se indica.

– Medio para estudios a distintos pH

Se preparó un medio base formado por glucosa 3g; extracto de levadura 3g; ac. cítrico 3 g; PO₄HK₂ 10 g; tris 6 g; agua destilada hasta 1000 ml. Porciones de 175 ml de medio base se ajustaron con ClH 1 N o NaOH 1 N a los valores de pH 3, 5, 7, 8'5, 9'5 y 10'5, ajustándose con agua destilada el volumen final a 200 ml y esterilizándose por filtración.

– Medio de salinidad variable

Se utilizó agua salina con una cantidad de sales equivalente a una salinidad del 43‰, frecuente en el Mar Menor, y la siguiente composición: ClNa 27'89 g; ClK 0'81 g; Cl₂Mg · 7H₂O 6'16 g; SO₄Mg · 7H₂O 8'13 g; agua destilada hasta 1000 ml.

Con extracto de levadura al 0'3% y Tris al 0'85%, se prepararon medios de salinidad variable (43, 32, 2 y 0‰) adicionando las correspondientes proporciones de la solución anterior a agua destilada. En estos medios, el pH se ajustó a 8'2 y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

D) *Condiciones experimentales*

200 ml de medios o aguas marinas fueron introducidos en matraces Erlenmeyer de 250 ml. Después de la inoculación se incubaron a temperatura ambiente (18 a 22°C) en un baño con agitación a 100 r.p.m.

E) *Recuentos*

A diversos tiempos de incubación se tomaron muestras de los matraces que se diluyeron a 1/10 en una solución de Cirrasol

0'1 más P₂O₇Na₂ 0'1% y se agitaron durante 1 minuto para facilitar la dispersión. Seguidamente se diluyeron adecuadamente en AMA y se sembraron alícuotas de 0'1 ml por triplicado para cada dilución, por la técnica de extensión en placa. Se utilizó el medio Sabouraud salino para *C. utilis* e incubación a 30°C y el medio de Buck y Bubucis e incubación a 37°C para *C. albicans*. A 48 h tras la siembra se realizó el recuento de colonias. En otros casos se estimó la biomasa del cultivo por medida de la absorbancia a 600 nm como se ha indicado previamente.

RESULTADOS Y DISCUSION

AISLAMIENTO Y RECuento

La tabla 1 y la fig. 1 muestran los resultados obtenidos en los recuentos de levaduras totales en aguas y sedimentos de las estaciones G₁ a G₈ de la desembocadura del río Segura en el mes de octubre. Los valores para aguas oscilaron desde 206 UFC/100 ml en agua muy contaminada de G₁, a 0'5 UFC/100 ml en aguas de G₅, G₆ y G₇. Como se aprecia en la fig. 1, existe un gradiente en los recuentos de levaduras totales, más marcado en aguas que en sedimentos, por efecto de la dilución del agua del río en el mar.

	S	A	S	A	S	A	S	A
	G ₁		G ₂		G ₃		G ₄	
LT	24.157	206	347	173	4.824	167	247	20
M	906	7	63	15	30	9	31	2
	G ₅		G ₆		G ₇		G ₈	
LT	215	5	151	0	266	4'6	301	13
M	376	1	903	0	59	4	0	17

TABLA 1.—Recuentos de levaduras totales (LT) o mohos (M) obtenidos en las estaciones de muestreo G₁ a G₈ de la desembocadura del río Segura en el mes de Octubre de 1982. Para sedimentos (S) los valores representan UFC/100 g y para aguas UFC/100 ml. (A).

En otra serie de muestras se determinó la variación estacional de los recuentos a lo largo de un año en el punto más conta-

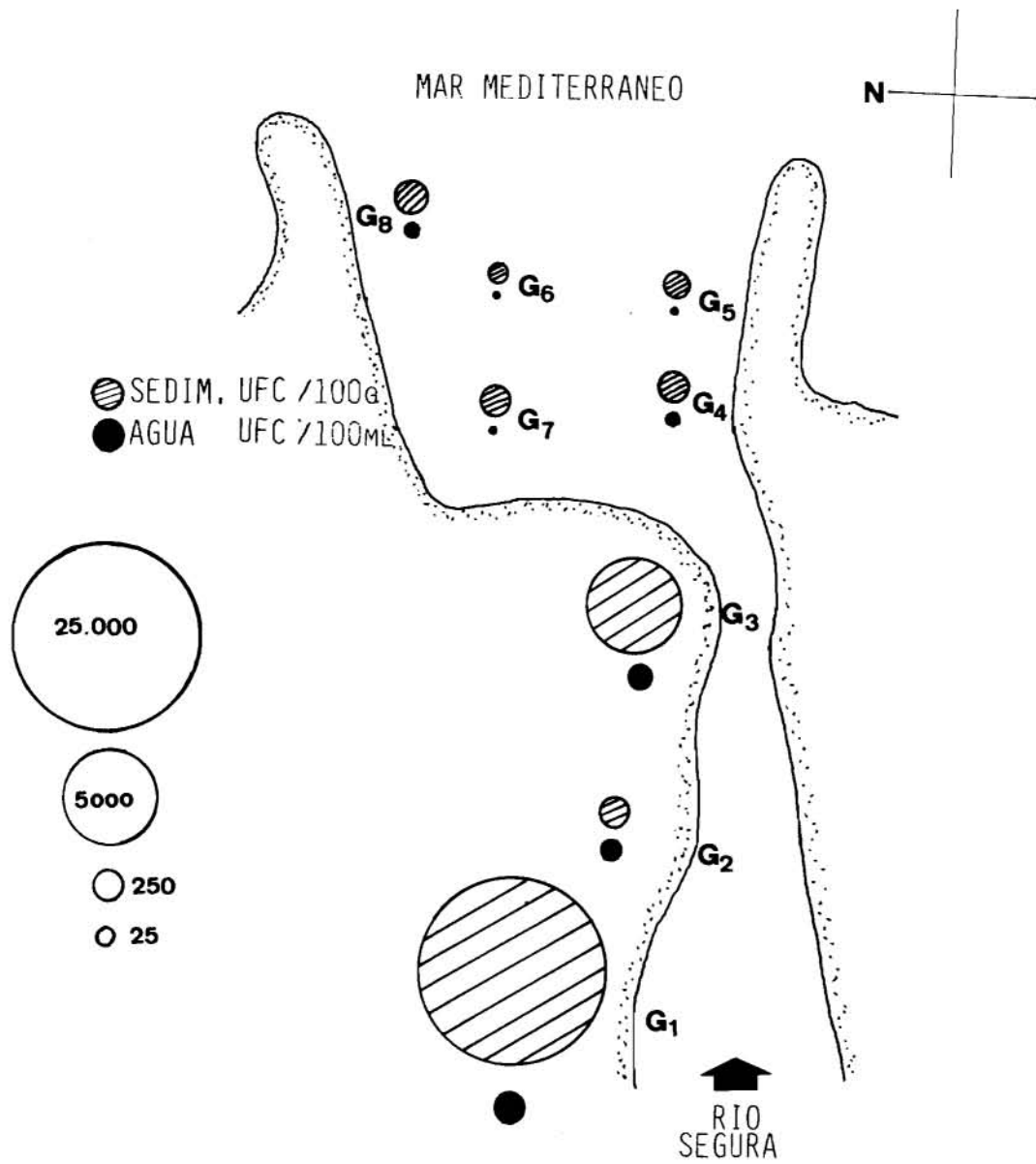


FIG. 1.—Estaciones de muestreo de la desembocadura del río Segura y representación gráfica de los resultados de recuento de levaduras expresados en la tabla 1.

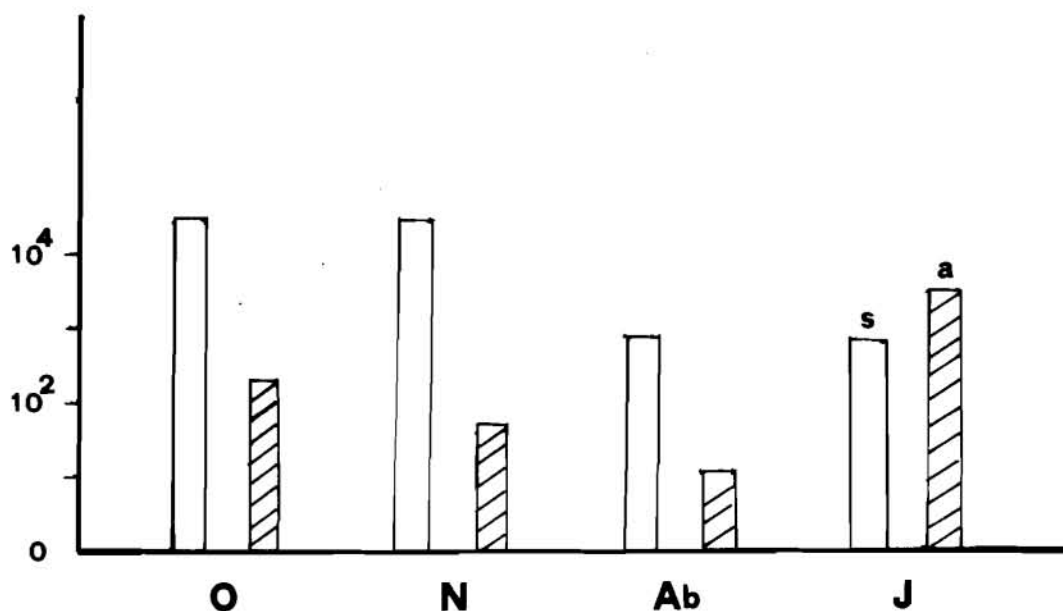


FIG. 2.—Recuentos de levaduras totales en la estación de muestreo G₁, durante los meses de Octubre, Noviembre, Abril y Junio. Los valores en ordenadas expresan UFC/100 ml para aguas (a) y UFC/100 g para sedimentos (s).

minado G₁ (Fig. 2). Promediando los recuentos de aguas y sedimentos, se observa una menor abundancia de levaduras en primavera y un incremento durante los meses de verano y otoño.

En la Fig. 3 se muestran los recuentos de levaduras totales y levaduras rojas en el Mar Menor (estaciones P₁ a P₇) durante el período de muestreo. Se observó un máximo en aguas y sedimentos en septiembre-octubre y un mínimo en enero, lo cual puede estar asociado, no sólo al cambio climático estacional, sino también al incremento notable de la población turística en la época estival, y por ello los vertidos de aguas residuales. Los recuentos más elevados obtenidos en sedimentos fueron los de octubre en las estaciones P₁ (14.280 UFC/100 g), P₂ (12.039 UFC/100 g), P₄ (10.620 UFC/100 g), P₅ (7.942 UFC/100 g) y P₆ (8.251 UFC/100 g). En aguas, los mayores recuentos se obtuvieron en septiembre y octubre en los puntos antes citados y los valores oscilaron en torno a 10² UFC/100 ml. Se determinaron asimismo los niveles de levaduras rojas, que resultaron ser por término medio 1/10 de los re-

cuentos de levaduras totales (Fig. 3), resultados que se aproximan a los obtenidos por HAGLER y MENDOÇA-HAGLER (8) en Brasil. Estos autores así como SPENCER y cols. (19), utilizan los recuentos de levaduras rojas como indicadores de contaminación. Sin embargo en el presente estudio, en algunos casos no hemos detectado levaduras rojas y sí levaduras saprofitas (Fig. 3) junto a otros microorganismos indicadores de contaminación (16).

Por todo ello, creemos que el recuento de levaduras rojas no es apropiado como indicador de contaminación en todos los casos, ya que este tipo de levaduras puede estar ausente y sin embargo existir contaminación detectada fácilmente con indicadores clásicos de la misma.

Comparando los datos de levaduras totales del Mar Menor y desembocaduras del río Segura con los de otros microorganismos indicadores de contaminación fecal en las mismas muestras (16), hemos establecido tres grados de contaminación en relación con los recuentos de levaduras totales (Tabla 2). HAGLER y MENDOÇA-HAGLER (8), han determinado en aguas costeras de

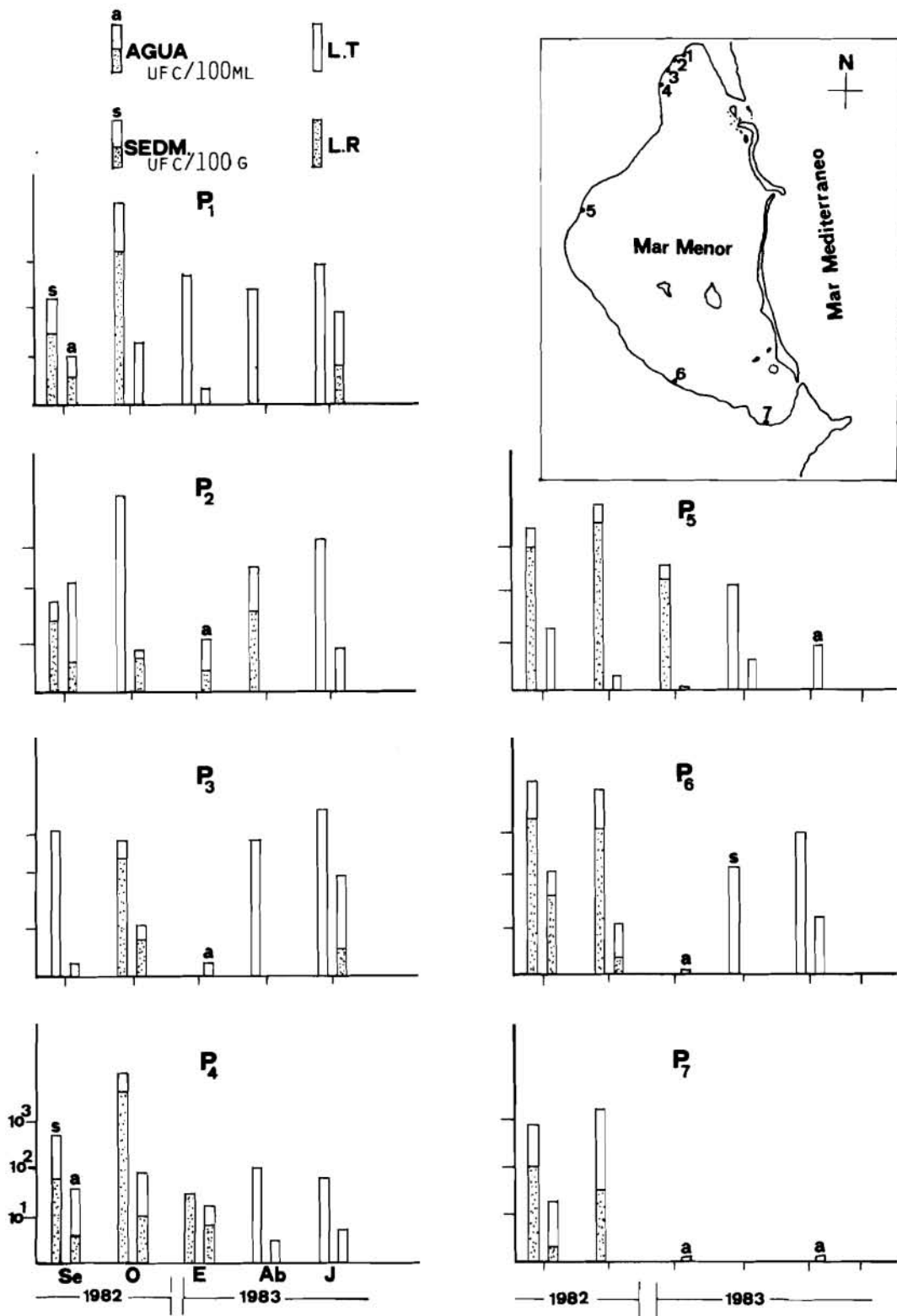


FIG. 3.—Estaciones de muestreo del Mar Menor (P₁ a P₇) y resultados obtenidos a lo largo de los meses de Septiembre a Junio de los recuentos de levaduras totales (L.T.) y levaduras rojas (L.R.) en aguas y sedimentos.

Brasil, niveles de levaduras totales más elevados que los obtenidos por nosotros. Sin embargo nuestros datos concuerdan con los de VAN UDEN y FELL (20) que establecen en diversos mares valores entre 2×10^3 y 5×10^4 UFC/100 g para sedimentos arenosos, 10^4 a 2×10^5 UFC/100 g en sedimentos negros y 0 a 60 UFC/100 ml para aguas.

Grado de contaminación	Aguas UFC/100 ml	Sedimentos UFC/100 gr
Bajo	0 - 10	0 - 10^2
Medio	10 - 10^2	10^2 - 10^3
Alto	$> 10^2$	$> 10^3$

TABLA 2.—Intervalos establecidos para los recuentos de levaduras con los niveles de contaminación bacteriana detectados en el Mar Menor. (Véase texto).

Los recuentos específicos de *C. albicans* se realizaron desde abril a julio en puntos muy contaminados del Mar Menor (P₁, P₃, P₄) y de la desembocadura del río Segura (G₀). Los recuentos de colonias-

confirmadas como *C. albicans* (Fig. 4), aparecen en la Fig. 5. El valor máximo fue de 45 UFC/1 en agua de G₀.

La información sobre *C. albicans* en ambientes salobres y marinos es escasa. VAN UDEN y FELL (8) citan su aislamiento, pero sin datos cuantitativos. BUCK y BUBUCIS (3), hacen recuentos por la técnica seguida por nosotros y obtienen de 3 a 83 UFC/1 en aguas de mar contaminadas, en tanto que en ríos y estuarios los valores oscilan entre 2 y 125 UFC/1. SHERRY y cols. (18) han determinado en puntos contaminados del lago Ontario recuentos de hasta 25 UFC/1 de *C. albicans* en los meses de verano. Se considera que *C. albicans* encontrada en aguas, tiene un origen fecal. En este sentido, se ha detectado entre 0 y 4×10^3 UFC/1 de *C. albicans* en aguas residuales urbanas (5).

Los recuentos de mohos en aguas fueron como máximo de 200 propágulos/100 ml en la época cálida y un mínimo de 1 a 50 en enero. Los niveles de propágulos de hongos (masas de micelio, fragmentos de

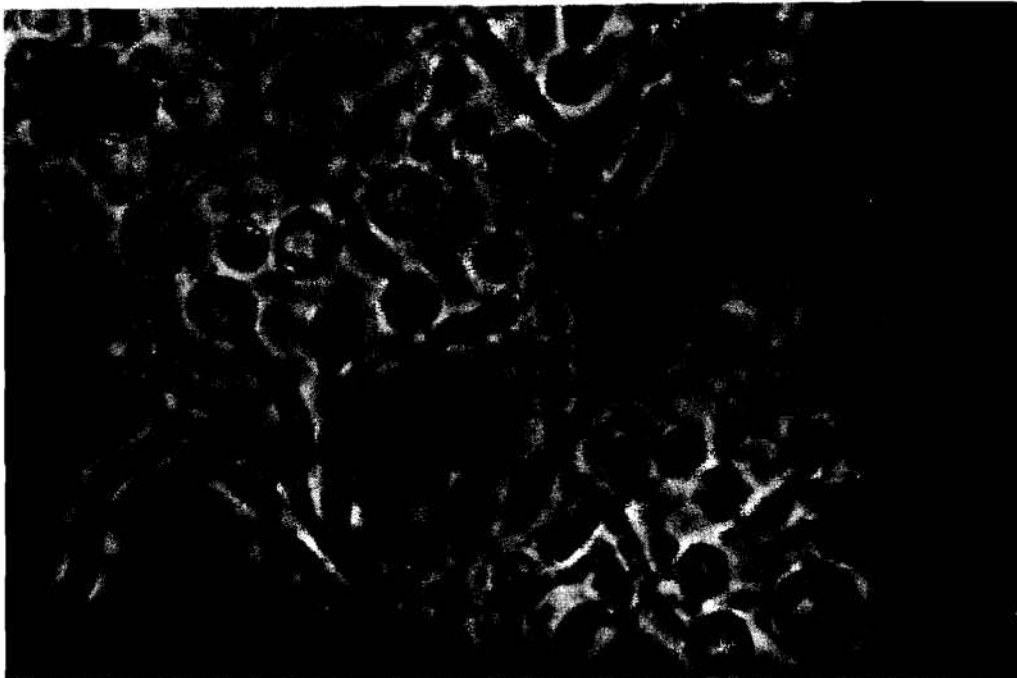


FIG. 4.—Prueba de filamentación en suero, característica de *C. albicans*. Puede apreciarse la formación de pseudomicelio y clamidosporas. Contraste de fases, objetivo de 40 x.

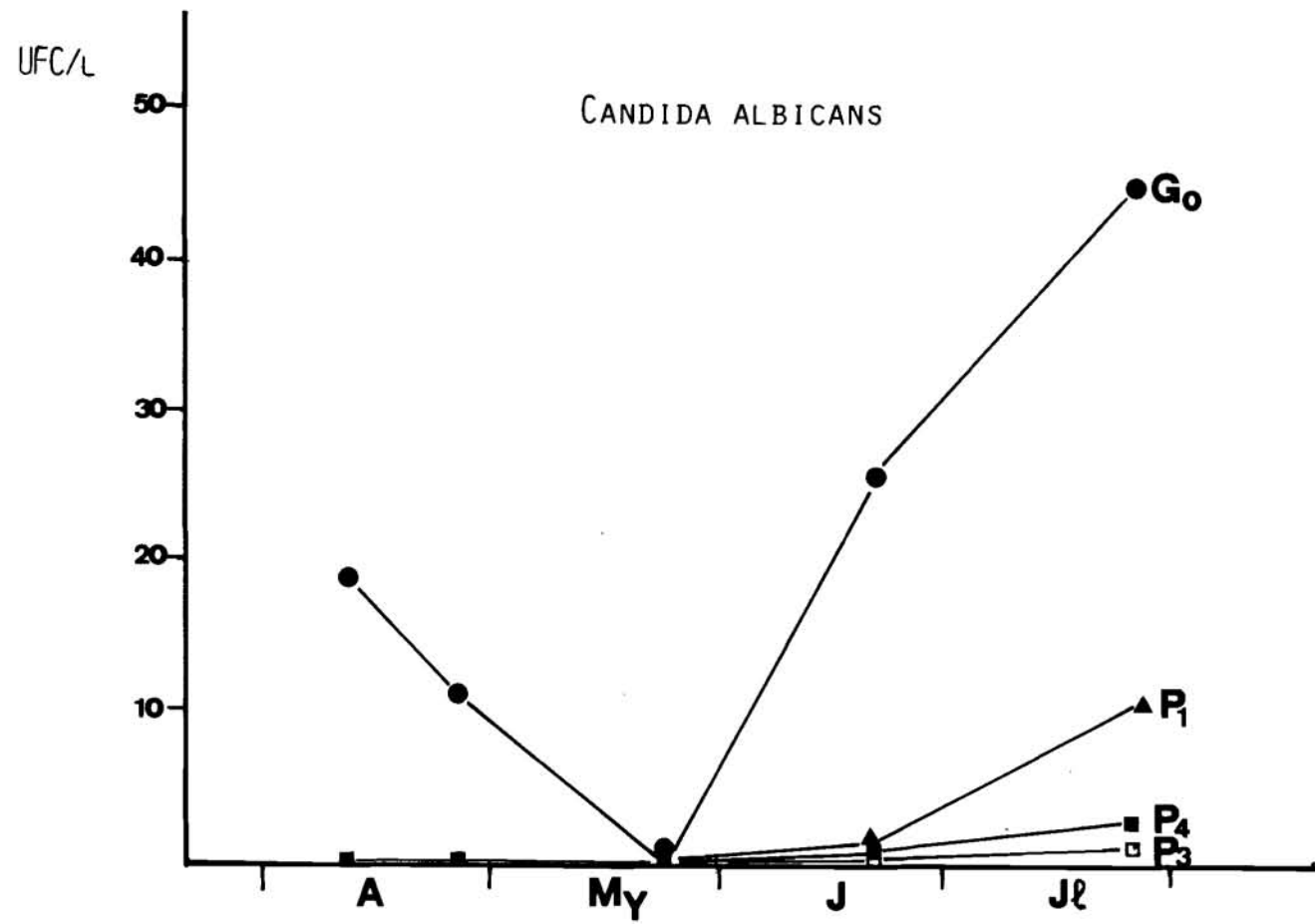


FIG. 5.-Niveles de *C. albicans* obtenidos en los recuentos de aguas de las estaciones G₀ de la desembocadura del río Segura y P₁, P₃, P₄ del Mar Menor, durante los meses de Abril, Mayo, Junio y Julio de 1983.

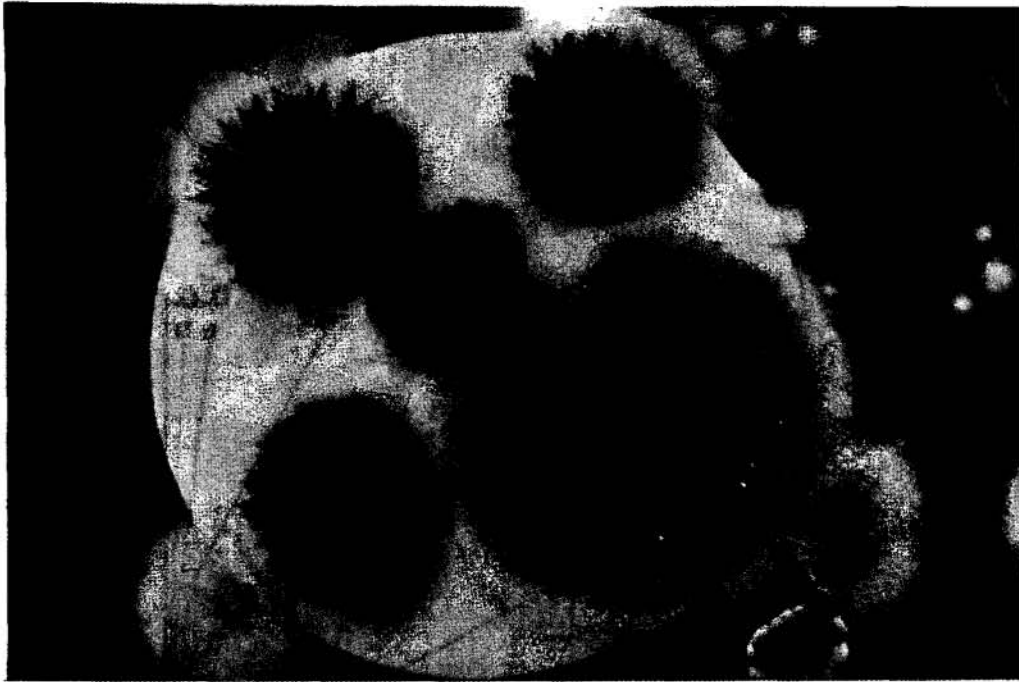


FIG. 6.-Invasión de un filtro de membrana sobre medio Sabouraud salino a las 48 horas de incubación, por mohos que impiden el recuento de levaduras. Con mayor frecuencia los mohos invasivos pertenecían a los géneros *Rhizopus* y *Aspergillus*.



FIG. 7.-Ensayo de medios de cultivo para el recuento de levaduras. Las dos placas de la izquierda corresponden a medio Sabouraud salino. Las placas centrales al mismo medio adicionado de 0.2 mg/ml de R.B. y las de la derecha 1 mg/ml de R.B. Obsérvese la eficaz disminución del tamaño de las colonias de moho en los medios con R.B.

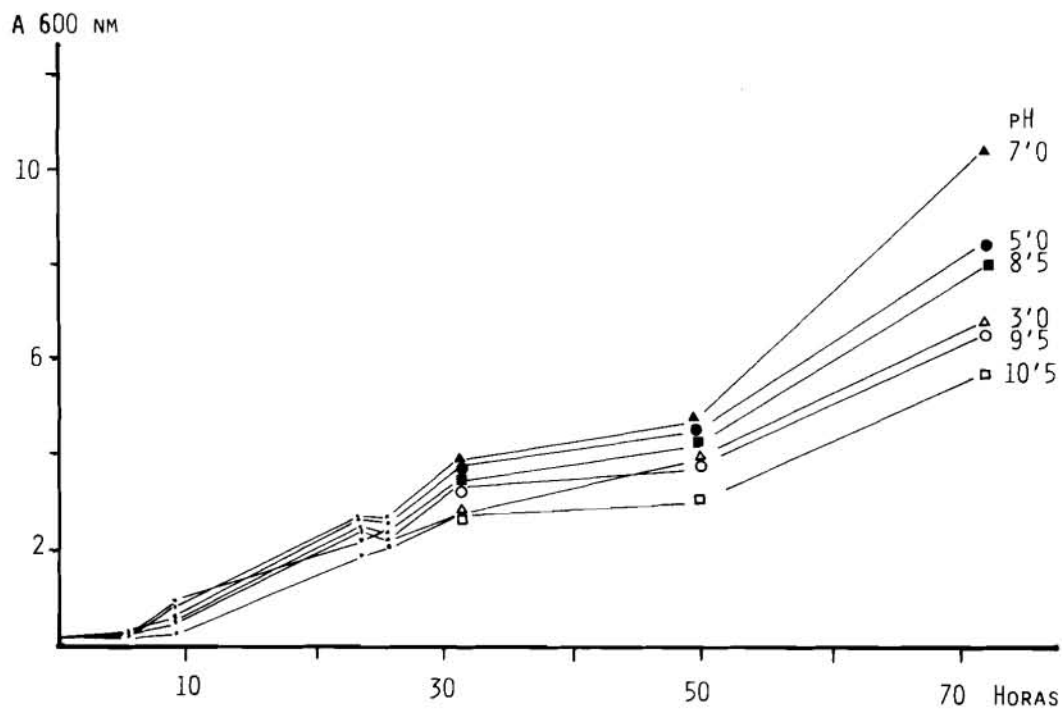
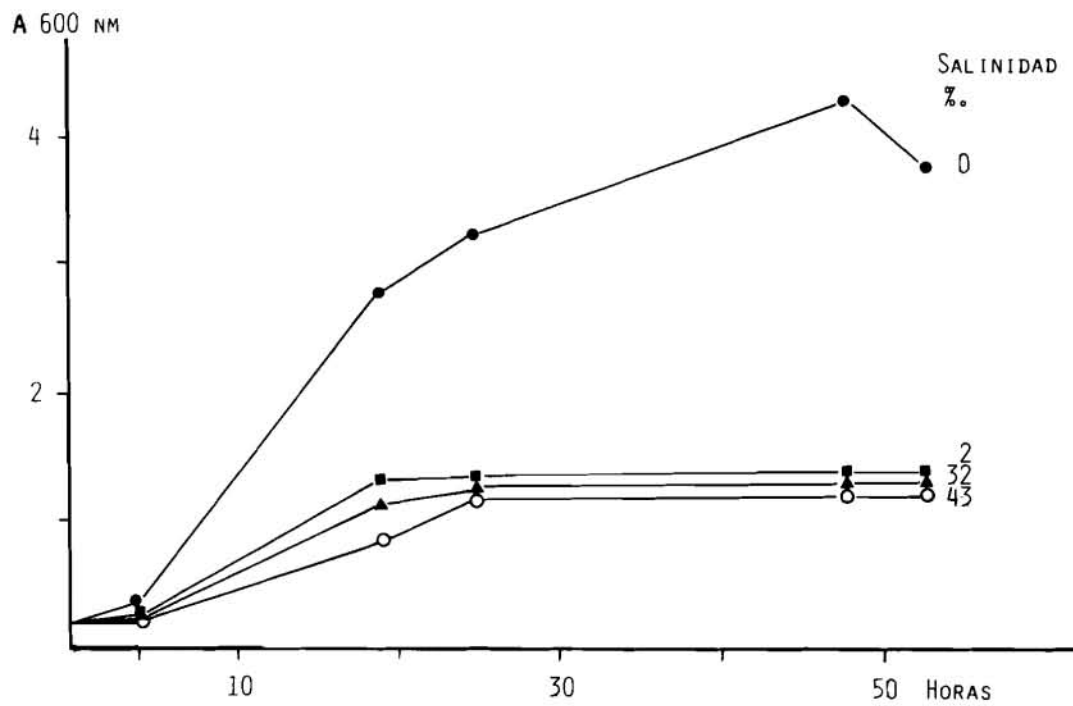


FIG. 8.—Influencia de la salinidad y pH sobre el crecimiento de *C. utilis* en medio complejo a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ (véase «Material y Métodos»). En ordenadas se expresan los valores de absorbancia a 600 nm.

hifas o esporas) en aguas marinas, han sido utilizados como trazadores para estudiar movimientos de las aguas debido a las mareas; la mayor parte de estos propágulos tienen un origen terrestre y su presencia en el agua depende en gran parte de la acción del viento y la lluvia (4). Ha sido señalada también la asociación entre hongos filamentosos y algas o macrofitas, que puede dar lugar a una parte importante de los propágulos presentes en el agua marina (6, 15).

- *Ensayo de medios de cultivo*

El medio de cultivo utilizado para recuento de levaduras totales (Sabouraud salino) es similar al de otros autores (8, 20), con objeto de obtener resultados comparables. Sin embargo, este medio presenta el inconveniente de una frecuente contaminación por mohos invasivos que hacen difícil el recuento de levaduras (Fig. 6). Por

esta razón ensayamos otras técnicas y medios de cultivo con objeto de eliminar dicho inconveniente. Los resultados obtenidos aparecen en la tabla 3. En ningún caso hubo contaminación bacteriana. Los recuentos de levaduras no presentaron diferencias significativas entre los medios ensayados. El medio Sabouraud salino en anaerobiosis, fue el más eficaz en la inhibición del crecimiento de mohos. Por otra parte, dado que en los sedimentos marinos las condiciones son fundamentalmente anaerobias, creemos que este sistema puede ser un modelo más adecuado que la incubación aerobia utilizada hasta ahora para el aislamiento de levaduras marinas en sedimentos (20). Con la técnica anaerobia, fue necesaria una incubación de 15 días para observar colonias de tamaño similar al obtenido en condiciones aerobias en solo 2-3 días. Esta diferencia en los tiempos de incubación se correlaciona con el metabolismo fermentativo que presentan las levaduras en anaerobiosis.

ENSAYO MEDIOS DE CULTIVO

Muestras		Sabouraud Salino	Sabouraud Sal. 0'2 mg/ml R.B.	Sabouraud Sal. 1 mg/ml R.B.	Sabouraud Sal. anaerobiosis	
G ₀	LT	2230	2250	2170	1120	UFC/100 ml
	M	220	170	190	0	
P ₁	LT	41	51	54	32	
	M	29	24	35	0	
P ₃	LT	21	12	19	18	
	M	540	680	250	0	
P ₄	LT	18	28	19	37	
	M	19	22	23	0	

TABLA 3.-Valores de los recuentos de levaduras totales (L.T.) y mohos (M) sobre diversos medios de cultivo ensayados, en aguas procedentes de las estaciones G₀ (desembocadura del río Segura) P₁, P₃, P₄ (Mar Menor). R.B. = Rosa de Bengala.

Se puede decir que el colorante Rosa de Bengala no afecta significativamente el recuento de levaduras totales, no sólo a la concentración de 0'2 mg/ml sugerida por BAGGERMAN(1), sino a la de 1 mg/ml que proponemos nosotros. Además, con esta última concentración de colorante, se reduce sustancialmente el tamaño de las colonias de mohos (Fig. 7) facilitando el recuento de levaduras.

- *Estudios de supervivencias «in vitro»*

Se estudió en primer lugar la influencia de diversas salinidades y pH sobre el crecimiento de *C. utilis* (Fig. 8) apreciándose un efecto marcado de la salinidad ya que el crecimiento fue muy reducido en los medios con salinidades de 2, 32 y 43% respecto al crecimiento en medios sin adición de sales.

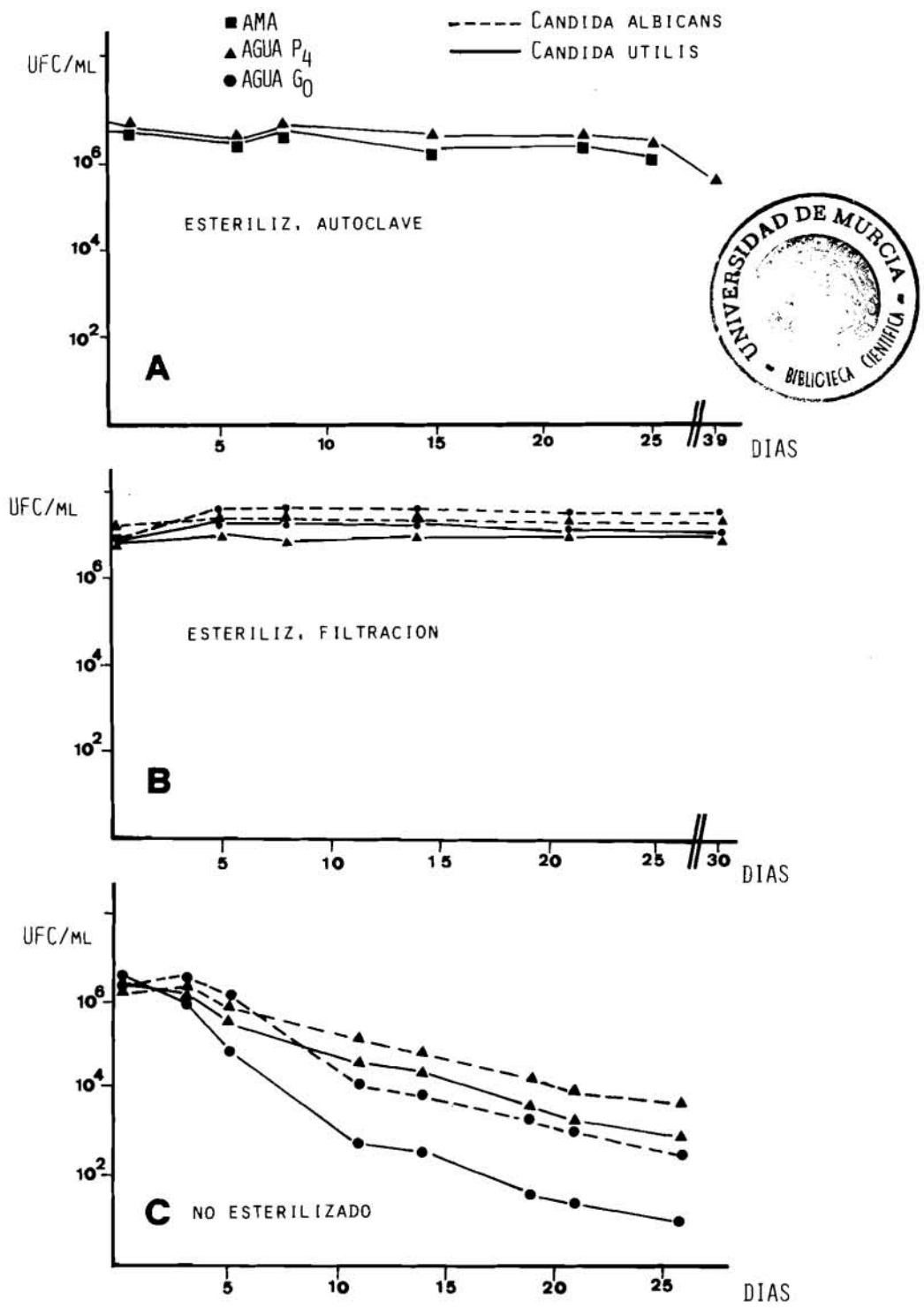


FIG. 9.-Supervivencia de *C. albicans* y *C. utilis* en agua marina de contaminación media procedente de la estación P₄ y agua salobre de elevada contaminación procedente de G₀, así como agua marina artificial (AMA). El protocolo seguido en estos experimentos se expresa con detalle en «Material y Métodos».

El efecto del pH fue más variado. El mejor crecimiento se produjo a pH 7, seguido de pH 5, 8.5, 3, 9.5 y 10.5. A pH 8.5, similar al del agua marina, la inhibición del crecimiento no es muy importante. Se puede pues suponer que *C. utilis* al ser introducida en el medio marino sufrirá una fuerte inhibición en el crecimiento por efecto de la salinidad, en tanto que el pH influirá en menor medida en su desarrollo.

En la Fig. 9 se observan los resultados obtenidos en el estudio sobre supervivencia de levaduras en aguas marinas y salobres. La Fig. 9 A, muestra la supervivencia de *C. utilis* en AMA y agua de mar procedente de P₄, ambas esterilizadas por autoclave. Puede observarse que el número de células viables determinado por recuento de colonias en placa de Petri, se mantuvo con pocas variaciones hasta los 39 días, sin encontrarse diferencias significativas.

Se ensayaron también aguas esterilizadas por filtración procedentes de P₄, de contaminación media, y de G₀, de elevada contaminación. Los resultados se representan en la Fig. 9B, donde se aprecia la buena supervivencia de *C. utilis* y *C. albicans*, durante un período de 30 días. En otra experiencia, cuyo resultado se muestra en la Fig. 9C, se emplearon aguas naturales no estériles de P₄ y G₀. Se observó una disminución muy rápida de la supervivencia ya que entre los 5 y 10 días la población celular se redujo al 10% de la inicial en todos los casos, y al cabo de 25 días a menos de 1%. Sin embargo, este efecto fue más marcado en *C. utilis* que en *C. albicans*. Por otra parte, las aguas de G₀ presentaron un efecto destructor sobre levaduras mayor que los de la estación P₄, tanto sobre *C. utilis* como sobre *C. albicans*. La supervivencia en aguas esterilizadas por filtración, se extendió para comparar los resultados con los de aguas autoclavadas, ya que el tratamiento en autoclave puede producir cambios en el agua que afectan la viabilidad de los microorganismos, tales como la destrucción de sustancias nutritivas, antibióticas o la eliminación de compuestos volátiles. Las diferencias observadas entre aguas autoclavadas y esterilizadas no son

significativas. Se señala la posibilidad de que la acción antifúngica de aguas no estériles sea debida a la actividad de microorganismos, posiblemente bacterias o protozoos, presentes en las aguas no estériles. Esto está apoyado por el hecho de que en el agua de mayor carga bacteriana (G₀) el efecto sobre la viabilidad es mayor. Posiblemente el mecanismo se deba a la acción de enzimas extracelulares capaces de hidrolizar los constituyentes de las paredes celulares de levadura. Sorprende en principio el hecho de que la levadura potencialmente patógena *C. albicans* sea más resistente que la saprofítica *C. utilis*. Sin embargo, al tener *C. albicans* su hábitat natural en el tubo digestivo de hombre y animales, debe estar mejor adaptada a la supervivencia en este medio de alta densidad bacteriana. Cabe preguntarse si la mayor adaptación de *C. albicans* consiste en disponer de una pared celular cuya composición hace más difícil su degradación que la de otras especies de levadura saprofíticas.

Otros autores han realizado experiencias de supervivencia de levaduras en aguas marinas. KRIS (10) utilizó agua marina filtrada a la que inoculó 10⁵ células/ml de diversas especies de levaduras de los géneros *Torulopsis*, *Sporobolomyces* y *Rhodotorula*. Detectó incrementos del número de células al cabo de 20 días, si bien a los 30 días hubo estabilización o disminución del mismo. Nosotros, partiendo de 5 × 10⁶ células/ml hemos encontrado tanto en *C. utilis* como en *C. albicans* un ligero incremento hasta niveles de 10⁷ células/ml en aguas esterilizadas por filtración. Sin embargo estos incrementos del número de células no estaban acompañados de un incremento real de la biomasa total ya que el tamaño celular de las levaduras disminuía considerablemente.

BUCK (2) ha estudiado la supervivencia de células de *C. albicans* dentro de bolsas de diálisis introducidas en agua marina no estéril y circulante. Los resultados obtenidos por este autor son similares a los nuestros, pese a que las células de *C. albicans* no estaban en contacto directo con las bacterias y otros organismos del agua marina.

AGRADECIMIENTOS:

Este trabajo ha sido financiado, en parte, por la CAICYT. Proyecto n.º 573/81.

BIBLIOGRAFIA

- 1.-BAGGERMAN, W.L., 1981.-A modified Rose Bengal Medium for the Enumeration of Yeasts and Moulds from Foods. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 12: 242-247.
- 2.-BUCK, J.D., 1978.-Comparison of *in situ* and *in vitro* survival of *Candida albicans* in Seawater. *Microbial Ecology* 4: 291-302.
- 3.-BUCK, J.D.; BUBUCIS, P.M., 1978.-Membrane Filter Procedure for Enumeration of *Candida albicans* in Natural Waters. *Appl. Env. Microb.* 35: 237-242.
- 4.-CHRZANOWSKI, T.H.; STEVENSON, L.H.; SPURRIER, J.D., 1982.-Seasonal variability and Transport of suspended microfungi in a southeastern salt marsh. *Appl. Environ. Microbiol.* 43: 392-296.
- 5.-COOK, W.L.; SCHLITZER, 1981.-Isolation of *Candida albicans* from Freshwater and Sewage. *Appl. Env. Microb.* 41: 840-842.
- 6.-GESSNER, R.V., 1977.-Seasonal occurrence and distribution of fungi associated with *Spartina alterniflora* from a Rhode Island estuary. *Mycologia*, 69: 477-491.
- 7.-GOLDSTEIN, S.; 1973.-Zoosporic marine fungi (Thraustochytriaceae and Dermocystidiaceae) *Ann. Rev. Micr.* 13-26.
- 8.-HAGLER, A.N.; MENDOÇA-HAGLER, L.C. 1981.-Yeasts from Marine and Estuarine Waters with Different Levels of Pollution in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Appl. Env. Microb.* 41: 173-178.
- 9.-HUGHES, G.C., 1975.-Studies of fungi in oceans and estuaries since 1961. I. Lignicolous, Caulicolous and Folticolous species. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.*, 13: 69-180.
- 10.-KRISS, A.E., 1963.-*Marine Microbiology*. Oliver and Boyd Ltd. Edimburgo y Londres.
- 11.-MILLER, J.D.; WHITNEY, N.J., 1981 a.-Fungi from the Bay of Fundy I: lignicolous marine fungi. *Can. J. Bot.* 59: 1128-1133.
- 12.-MILLER, J.D.; WHITNEY, N.J., 1981 b.-Fungi from the Bay of Fundy. II. Observations of Fungi From Living and Cast Seaweeds. *Botánica Marina*, 24: 405-411.
- 13.-MILLER, J.D.; WHITNEY, H.J., 1981 c.-Fungi of the Bay of Fundy III: geofungi in the Marine Environment. *Marine Biology*, 65: 61-68.
- 14.-MILLER, J.D.; WHITNEY, N.J., 1981 d.-*Fungi of the Bay of Fundy IV: Thraustochytrids*. Nova Hedwigia. Band XXXV. Braunschweig, 1981. J. Cramer.
- 15.-NEWELL, S.Y., 1981.-Fungi and Bacteria in or on Leaves of Eelgrass (*Zostera marina* L.) from Chesapeake Bay. *Appl. Env. Microb.*, 41: 1219-1224.
- 16.-PAGAN, F.A.; VICTORIA, G.; GACTO, M.; TORRELLA, F.; 1983.-Distribución de virus en medios costeros: influencia de los factores ambientales en la supervivencia y estado físico de los colifagos. Comunicación al VIII Congreso Nacional de Microbiología. Valladolid.
- 17.-SECRETAIN, G.; DROUHET, E.; MARIAT, F.; 1974.-*Diagnostic de laboratoire en mycologie medicale*. Edit. Maloine S.A. Paris.
- 18.-SHERRY, J.P.; KICHMA, S.R.; DUTKA, B.J., 1979.-The occurrence of *Candida albicans* in lake Ontario bathing beaches. *Can. J. Microbiol.* 25: 1036-1044.
- 19.-SPENCER, J.F.T.; GORIN, P.A.J.; GARDNER, N.R., 1974.-Yeasts isolated from some lakes and rivers of Saskatchewan. *Can. J. Microbiol.* 20: 949-954.
- 20.-VAN UDEN, N.; FELL, J.W., 1968.-Marine Yeasts. *Advances in Microbiology of the Sea*, 1:167-199.
- 21.-WOOLLETT, LL.; HEDRICK, L.R., 1970.-Ecology of yeasts in polluted water. *Antoine van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.* 36: 427-435.