

## Caracterización micológica de aguas "crudas" y filtradas en la Planta de Tratamiento de Tres Ríos, Costa Rica

Carmen Isabel Valiente Alvarez

Laboratorio Control de Calidad, Instituto Costarricense de Acueductos y Alcantarillados, 400m N del Palacio Municipal de Tres Ríos, Costa Rica.

(Rec. 30-X-1992. Acep. 3-VI-1993)

**Abstract:** Ascomycetes, Zygomycetes and Deuteromycetes were identified in raw and filtered water from rivers Orosi and Tiribí, in a Costa Rican water treatment plant. Three hundred and six samples were analyzed by the filtration membrane technique, cultivation in Sabouraud Glucose broth containing  $300\mu\text{g ml}^{-1}$  of chloramphenicol and incubated at room temperature for a minimum of two weeks. Coliform bacteria and turbidity were also recorded. A total of 1156 fungal strains were isolated: 63% were filamentous and 37% yeast forms, corresponding to twenty two genera. *Candida* represents 19% of the total fungi, and it was the most common potentially pathogenic genus. *C. albicans* was isolated in waters from the Orosi dam and the Tiribí river and its abundance was related with turbidity; 97.4% of the isolations in the treated water were yeast, (86% *Candida*, 36% were *C. albicans*), followed by *Geotrichum candidum*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces* and *Trichosporon*. Most filamentous fungi were eliminated in the process. This may be a common situation in tropical countries and represents a special danger to immunosuppressed patients.

**Key words:** Water mycology, fungi, water supplies, treatment plants, yeast, raw water, *Candida*, AIDS.

En el agua sin contaminación, generalmente cerca de la fuente, el número de esporas de hongos superiores es mínima, pero existe gran cantidad de hongos acuáticos inferiores (Mastigomycotina), Hyphomycetes y escasos hongos del suelo (Hofkes *et al.* 1986). En aguas superficiales moderadamente contaminadas ésta relación se invierte, encontrándose pocos hongos acuáticos y mayor número de hongos del suelo. En aguas muy contaminadas lo que se encuentra es gran cantidad de hongos del suelo (Clesceri *et al.* 1989).

En los procesos de tratamiento y desinfección del agua se utiliza como indicador microbiológico de su calidad al grupo de bacterias coliformes (Pelczar *et al.* 1977, Clesceri *et al.* 1989, Cooper 1980). Por el momento no se ha identificado hongos cuya presencia pueda ser utilizada como indicador de contaminación. Sin embargo, es de importancia para la salud del in-

dividuo que el agua esté libre de otros microorganismos potencialmente patógenos, como bacterias no coliformes, hongos, virus, protozoos, helmintos y algas tóxicas (Clesceri *et al.* 1989).

Actualmente, con variedad de enfermedades como SIDA, cáncer, lupus eritematoso y leucemias, así como tratamientos inmunosupresores que afectan a muchas personas, no es recomendable que éstas utilicen aguas con agentes potencialmente patógenos, pues son especialmente susceptibles de sufrir micosis graves (Emmons *et al.* 1977, Cooper 1980, Meunier-Carpentier *et al.* 1981, Reingold *et al.* 1986, Matsumoto *et al.* 1987, Kassamali *et al.* 1987, Crislip y Edwards 1989, Buck 1990). La ingestión de esporas de hongos puede ocasionar daños locales en la mucosa gastrointestinal o producir micosis sistémicas por *Candida* (Wingard *et al.* 1980, Walsh y Merz 1985, Crislip y Edwards 1989).

Por lo anterior es importante determinar la eficiencia de los procesos de purificación del agua en cuanto a la remoción de microorganismos que no sean las bacterias coliformes. Esta investigación tiene como objetivo determinar la flora micológica del agua cruda que ingresa a una planta de tratamiento y estudiar su remoción en el proceso, en una localidad urbana neotropical.

### MATERIAL Y METODOS

**Muestra:** Se seleccionó la Planta Alta de Tres Ríos, por ser la más grande de Costa Rica. En ella ingresa agua del embalse de Orosí y del río Tiribí. El agua se recolectó en frascos de vidrio estériles de 125ml, a la entrada del agua cruda y a la salida de los filtros en la planta de tratamiento. Las muestras se recolectaron tres veces al día: 5:00, 11:00 y 18:00 horas, durante cuatro meses, febrero a mayo, período que comprende el final de la estación seca y el inicio de la lluviosa.

**Aislamiento bacteriológico:** Para el aislamiento de bacterias coliformes totales y fecales se utilizó la técnica de tubos múltiples, obteniendo el número más probable de bacterias por 100ml de muestra (Clesceri *et al.* 1989).

**Aislamiento micológico:** Utilizando la técnica de membrana filtrante (Clesceri *et al.* 1989) y en un aparato para filtración al vacío, se filtraron 100ml de muestra a través de una membrana de nitrato de celulosa esterilizada,

de 0.45 $\mu$  con diámetro de 47mm. Una vez finalizado el proceso de filtración la membrana se colocó de manera estéril en una caja de petri de 6cm de diámetro, sobre una almohadilla de acetato de celulosa impregnada con 3ml de medio de cultivo, caldo Sabouraud Glucosado, suplementado con 300 $\mu$ g ml<sup>-1</sup> de Cloranfenicol. Las cajas se incubaron a temperatura ambiente por un mínimo de dos semanas.

**Identificación:** Las colonias que crecieron en la placa de petri se montaron en azul de lactofenol o en lactofenol incoloro para el examen microscópico y se repicaron a tubos con 8ml de medio de Agar Sabouraud Glucosado, para posteriormente realizar el examen macro y microscópico del cultivo puro. Se realizaron las pruebas de resistencia a la cicloheximida y de tubo germinativo, a las cepas de *Candida* para la identificación de *C.albicans* (Ainsworth *et al.* 1973, Muller y Loeffler 1976, Emmons *et al.* 1977, Pelczar *et al.* 1977, Cooper 1980).

### RESULTADOS

En el Cuadro 1 se observan los resultados mensuales. Para un total de 306 muestras, se aislaron 1156 cepas de hongos de las sub-divisiones Ascomycotina, Zygomycotina y Deuteromycotina (Cuadro 2). De estos, el 63% fueron filamentosos y el 37% levaduriformes. El género potencialmente patógeno más común fue *Candida* (19%), *C.albicans* representó el 8% del total de hongos aislados y el 22% del total de levaduras.

CUADRO 1

Análisis microbiológico y turbiedad en las muestras de agua del Embalse Orosi y del Río Tiribí, Planta Alta de Tres Ríos

Agua cruda	Mes	Total muestras	Total hongos	<i>Candida albicans</i>	Xg		mín	Turbiedad	
					CT	CF		$\bar{x}$	máx
Orosi	Febrero	33	88	13	45	27	0.4	1.5	5.7
	Marzo	22	62	4	36	11	0.4	1.0	7.0
	Abril	65	256	7	135	32	0.5	1.3	7.0
	Mayo	33	142	10	769	114	0.7	2.6	20.0
			153	548	34	153	32	0.4	1.6
Tiribí	Febrero	33	94	17	1571	435	2.1	2.7	5.2
	Marzo	22	72	10	3148	322	1.9	5.0	30.0
	Abril	65	291	21	2984	508	0.2	3.3	43.0
	Mayo	33	151	13	3322	2633	1.4	7.8	50.0
			153	608	61	2646	658	0.2	4.7

Xg= Promedio Geométrico. C=Coliformes 100ml<sup>-1</sup>, T=totales, F=fecales. Turbiedad en U.N.T.

CUADRO 2

Hongos aislados en las aguas crudas de Orosí y Tiribí a su entrada a Planta Alta de Tres Ríos

Hongos aislados	Total	Orosí	Tiribí
<i>Acrothecium</i>	2	2	0
<i>Aspergillus</i>	77	35	42
<i>Aspergillus niger</i>	9	9	0
<i>Aspergillus clavatus</i>	2	0	2
<i>Candida</i>	124	69	55
<i>Candida albicans</i>	95	34	61
<i>Cryptococcus</i>	2	0	2
<i>Cryptococcus neoformans</i>	1	0	1
<i>Curvularia</i>	4	4	0
<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	5	5	0
<i>Fusarium</i>	144	74	70
<i>Geotrichum candidum</i>	20	5	15
<i>Helminthosporium</i>	1	1	0
<i>Hormodendrum</i>	182	79	103
<i>Microsporium gypseum</i>	3	0	3
<i>Monilia sitophila</i>	16	16	0
<i>Mucor</i>	38	13	25
<i>Paecilomyces</i>	6	6	0
<i>Penicillium</i>	110	58	52
<i>Rhizopus</i>	104	42	62
<i>Rhodotorula</i>	64	38	26
<i>Saccharomyces</i>	98	39	59
<i>Sepedonium</i>	1	1	0
<i>Stemphylium</i>	3	3	0
<i>Trichosporon</i>	24	8	16
<i>Verticillium</i>	21	21	0
Total	1156	560	596

Los niveles de turbiedad en unidades nefelométricas (U.N.T.) presentan diferencias en los cuatro meses, encontrándose los valores mayores en mayo, tanto para las aguas del embalse de Orosí como del río Tiribí. Estos valores fueron de 20 y 50 U.N.T., con promedios de 2.6 y 7.8 U.N.T., respectivamente.

Los niveles de turbiedad mas altos mostraron una relación directa con el mayor aislamiento de *C.albicans* en estas aguas ( $X^2=21.36$ ;  $p > 0.05$ ). Se puede observar que *C.albicans* se comportó de manera diferente en Orosi y el Tiribí; uno de los factores que puede influir sobre esto es el nivel de turbiedad ( $X^2=3.04$ ;  $p < 0.05$ ).

Después del proceso completo en la planta de tratamiento, que comprende sulfatación, floculación, sedimentación y filtración, se encontró que de las 153 muestras del agua filtrada analizadas, cuatro fueron negativas a hongos, lo que representa el 2.6% del total. En las otras muestras se encontró que predominaban los

hongos levaduriformes, principalmente especies del género *Candida*, que estaban presentes en un 86%. Hubo menores concentraciones de *Geotrichum candidum*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces* y *Trichosporon*. Del total de muestras de agua filtrada, el 36% correspondió a la especie *C.albicans*; en varias muestras se encontró el hongo filamentoso *Fusarium*.

## DISCUSION

En estas aguas se encuentran grandes cantidades de hongos, tanto filamentosos como levaduriformes. Sin embargo, existe mayor concentración de ellos en las aguas del río Tiribí que en las del embalse Orosi. Aunque no puede concluirse que cada manto de agua tiene su flora característica, sí se observó que algunos hongos únicamente fueron encontrados o predominaban en uno de los dos sitios, así *Acrothecium*, *Aspergillus niger*, *Curvularia*,

*Fonsecaea pedrosoi*, *Helminthosporium*, *Monilia sitophila*, *Paecyomyces*, *Sepedonium*, *Stemphylium* y *Verticillium* únicamente se aislaron en Orosi. En Tiribí se aislaron exclusivamente *Aspergillus clavatus*, *Cryptococcus*, *Hormodendrum* y *Microsporium gypseum*. El género *Candida* se aisló en ambas muestras, pero se encontró el doble de cepas de *C. albicans* en las aguas de Tiribí. Este hallazgo es importante dado que esta es una levadura cuyo hábitat normal es el intestino humano y el de otros animales de sangre caliente, lo que puede reflejar niveles de contaminación fecal (Emmons *et al.* 1977, Rogers y Balish 1980, Casal Román *et al.* 1987, Crislip y Edwards 1989).

Aunque *C. albicans* continúa siendo la especie patógena más importante del género *Candida* (Emmons *et al.* 1977, Cooper 1980, Rogers y Balish 1980, Casal Román *et al.* 1987, Crislip y Edwards 1989, Clesceri *et al.* 1989, Buck 1990), recientemente se han realizado estudios que demuestran que no solo ella ocasiona problemas sanitarios, sino también las otras especies de este género (Emmons *et al.* 1977, Crislip y Edwards 1989). Actualmente los estudios con *C. tropicalis* ponen de manifiesto que la ingestión de esta especie por pacientes inmunocomprometidos puede ocasionar severos daños (Wingard *et al.* 1980, Walsh y Merz 1985).

De estos hallazgos se desprende la gran importancia de la presencia de estos hongos en las redes de distribución de agua, principalmente para los hospitales y centros de salud, y para las personas inmunocomprometidas. Está demostrado que en este grupo de huéspedes susceptibles muchos hongos, hasta los considerados inocuos, producen fungemias u otras micosis sistémicas (Emmons *et al.* 1977, Meunier-Carpentier *et al.* 1981, Reingold *et al.* 1986, Kassamali *et al.* 1987, Matsumoto *et al.* 1987).

En abril y mayo se detectaron mayores concentraciones de hongos en toda el agua. Así mismo, en estos meses se encontraron mayores niveles de turbiedad y mayores concentraciones de bacterias coliformes. Los niveles de turbiedad más altos mostraron una relación directa con el mayor aislamiento de *C. albicans*. Sin embargo, su comportamiento es diferente en las aguas de Orosi y Tiribí, debido posiblemente a diferentes niveles de turbiedad. El valor promedio de turbiedad en Orosi fue de 1.6 U.N.-

T. (máximo 20 U.N.T.); en Tiribí fue de 4.7 (máx. 50 U.N.T.). La captación del río Tiribí se realiza a muchos kilómetros de su origen, por lo que estas aguas recorren largos trechos sobre áreas pobladas y zonas de cultivo y ganadería antes de ingresar en la planta. La de Orosi es captada cerca de su nacimiento tras recorrer una zona de bosques en el Área de Conservación de Tapantí. Buena parte de la turbiedad de Orosi es producida por el río Humus (sustancias húmicas), mientras que la de Tiribí es ocasionada principalmente por contaminación orgánica y escorrentía que aumentan en la estación lluviosa (Hofkes *et al.* 1986).

En este estudio se observó que cuando el agua es sometida al proceso completo en la planta de tratamiento, se eliminan todos los hongos filamentosos, pero no los levaduriformes. Cuando el proceso no incluye sulfatación, persiste en el agua filtrada toda la flora micológica del agua cruda. Falta determinar si el proceso de desinfección del agua con cloro es eficiente para eliminar los hongos.

Uno de los problemas encontrados aquí es que a niveles altos de turbiedad, superiores a 5 U.N.T., se aisló mayor número de hongos filamentosos (*Fusarium*, *Hormodendrum*, *Monilia*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Verticillium*), los que al crecer rápidamente sobre toda la membrana impidieron analizar otros hongos de crecimiento más lento. Por esta razón, los niveles de turbiedad analizados están comprendidos entre un mínimo de 0.2 y un máximo de 5 U.N.T. Además a niveles de turbiedad superiores el método utilizado presenta otros inconvenientes. La filtración por membrana es recomendada para el análisis de aguas claras, pues los filtros se obstruyen con turbiedades muy altas (Clesceri *et al.* 1989). Cuando se tienen turbiedades mayores debe modificarse el método y utilizar un prefiltro o realizar diluciones de la muestra.

Podemos concluir que el agua en los sistemas cerrados de distribución, podría servir como vehículo para transportar hongos que puedan ocasionar severos problemas de salud a grupos de personas susceptibles. Debido a la presencia de grandes cantidades de hongos potencialmente patógenos en las aguas crudas, así como de la persistencia de levaduras después del proceso en la planta de tratamiento, considero importante continuar realizando estudios de esta flora micológica, determinando cuales

son las otras especies del género *Candida* presentes en el agua, su resistencia a la desinfección y su aislamiento en las redes de distribución. También conviene determinar si la relación entre la presencia de hongos y el grado de turbiedad está influenciada por los niveles de contaminación orgánica.

### AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Mariano Peinador Brolatto por su colaboración con la parte estadística. Al personal de la Planta Alta de Tres Ríos y del Laboratorio Central, por su ayuda desinteresada. La autora está adscrita al Programa Financiero de Apoyo a Investigadores del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas.

### RESUMEN

Se estudió la flora micológica (Ascomycotina, Zygomycotina y Deuteromycotina) de las aguas crudas a la entrada y salida de la planta de tratamiento de Tres Ríos, alimentada por el embalse de Orosí y el río Tiribí. El propósito del estudio fue determinar la prevalencia de hongos potencialmente patógenos. Se analizaron 306 muestras con la técnica de membrana filtrante, cultivos en Caldo Sabouraud Glucosado con  $300\mu\text{g ml}^{-1}$  de Cloranfenicol e incubación a temperatura ambiente por un mínimo de dos semanas. El estudio abarcó también la determinación de los niveles de bacterias coliformes y de turbiedad. De 1156 cepas de hongos aislados en el agua cruda el 63% fueron filamentosos y el 37% levaduriformes, correspondiendo a veintidós géneros. El género potencialmente patógeno más común fue *Candida* (19%), incluyendo a *C.albicans*, aislada en las aguas de Orosí y Tiribí, aunque con diferencias significativas relacionadas con los niveles de turbiedad. Aún después del proceso completo de tratamiento el 97.4% de las muestras eran positivas para levaduras, encontrándose en un 86% especies del género *Candida*, (36% *C.albicans*). Otras levaduras fueron *Geotrichum candidum*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces* y *Trichosporon*. La mayoría de los hongos filamentosos fueron eliminados en el proceso, pero *Candida* lo re-

siste, poniendo potencialmente en peligro a las personas con sistemas inmunológicos reducidos o ausentes.

### REFERENCIAS

- Ainsworth, G.C., F.K. Sparow & A.Sussman. 1973. The Fungi. Vol. IV. Academic, Nueva York, p.504.
- Buck, J.D. 1990. Isolation of *Candida albicans* and Halophilic *Vibrio* spp. from aquatic birds in Connecticut and Florida. Appl.Environ.Microbiol. 56:826-828.
- Clesceri, L.S., A.E. Greenberg & R.R. Trussell. 1989. Standard Methods for the examination of water and wastewater. Port City Press, Baltimore, vol. 9:183-197.
- Cooper, B.H. 1980. Fungi. p.533-668. In E.H.Lennette, A.Balows, W.J. Hausler & J.P. Truant. Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology, Washington D.C.
- Crislip, M.A. & J.E. Edwards. 1989. Systemic Fungal Infections: Diagnosis and Treatment II. Candidiasis p.103-133. In Infectious Disease Clinics of North America. Vol.3 N°2. Torrance, California.
- Emmons, C.W., C.H. Binford, J.P.Utz & K.J.Kwon-Chung. 1977. Medical Mycology. Lea & Febiger, Philadelphia, p.185-202.
- Hofkes, E.H., L. Huisman, B.B. Sudaresan, J.M. De Azevedo Netto & J.N. Lanox. 1986. Small Community Water Supplies. Technology of small water supply systems in developing countries. Wiley, Nueva York. p.51-56.
- Kassamali, H., E. Anaissie, J.Ro, K. Rolston, H. Kantarjian, V. Fainstein & G.P. Bodey. 1987. Disseminated *Geotrichum candidum* Infection. J. Clin. Microbiol. 25:1782-1783.
- Matsumoto, T., A.A. Padhye & L. Ajello. 1987. Medical Significance of the so-called black Yeast. Eur.J.Epidemiol. 3:87-95.
- Meunier-Carpentier, F., T.E. Kiehn & D. Armstrong. 1981. Fungemia in the immunocompromised host. Am. J. Med. 71:363-370.
- Muller, E. & W. Loeffler. 1976. Micología. Omega. Barcelona, p.142-312.
- Pelczar, M.J., R.D. Reid & E.C.S. Chan. 1977. Microbiology. McGraw-Hill, Nueva York. p.285-331, 761-806.
- Reingold, A.L., X.D.Lu, B.D. Plikaytis & L. Ajello. 1986. Systemic mycoses in the United States. J. Med. Vet. Mycol. 24:433-436.

- Rogers, T.J. & E.Balish. 1980. Immunity to *Candida albicans*. Microbiol. Rev. 44:660-682.
- Román, M.C., M.J. Linares Sicilia & C.M. Blanco Domínguez. 1987. Descripción de cuatro nuevas biovariedades de *Candida albicans* de interés clinicoepidemiológico. Enf.Infec. y Microbiol.Clin. 5:205-208.
- Walsh, T.J & W.G. Merz. 1985. Pathogenic features in the human alimentary tract associated with invasiveness of *Candida tropicalis*. Am. J. Clin. Pathol. 85:498-502.
- Wingard, J.R., W.G. Merz, G.R. Sandford, R. Saral & W.H. Burns. 1980. Pathogenicity of *Candida tropicalis* and *Candida albicans* after gastrointestinal inoculation in mice. Infec.Immun. 29:808-813.