

ACAROS TARSONEMUS - RESISTENCIA A LA CONGELACION

Dr. Dante Borelli
Dra. Kyria Borelli

Resumen

Penicillium glaucum y ácaros del género Tarsonemus fueron colocados en 20 tubos de 100 x 13 mm cerrados con tapones de algodón, contenientes 5 ml- cada uno de terreno laetrimel. A la semana, toda la superficie estaba ocupada por el moho y multitud de ácaros se desplazaban sobre éste. Los 20 tubos fueron entonces pasados a un congelador a -12° C. Sendos pares de tubos fueron retirados del congelador a los 30, 60, 120, 180, 240, 300, 360, 420, 480 y 540 minutos y posteriormente examinados por microscopio con 100 aumentos cada día por una semana. Sólo se encontraron ácaros vivos en los tubos congelados por 3 horas o menos. Todos los huevos congelados por más de 1 hora resultaron muertos. Los ácaros sobrevivientes de la congelación por 2 ó 3 horas murieron sin reproducirse en los 3 días siguientes. Ninguna merma se notó en la vitalidad de P. glaucum. Se comenta el uso de temperaturas bajas y altas en la lucha contra invasiones de cultivos fúngicos por ácaros.

SUMMARY

A Penicillium glaucum strain and mites of the genus Tarsonemus were transferred to 20 cotton plugged tubes, 100 x 13 mm in size, containing each 5 mL of the laetrimel medium, and were incubated at 22-24° C. After a week, the whole surface of the medium was found occupied by the mold that was actively foraged by a lot of mites. The 20 tubes were then put into a freezer at -12° C. Pairs of tubes were retrieved after 30, 60, 120, 180, 240, 300, 360, 420, 480 and 540 minutes and kept at 22-24° C. Microscopic controls through the tube walls were repeatedly made on the same day and on every following day for a week. No motile mite was seen in tubes refrigerated during more than 3 hours. A few mites survived in tubes refrigerated during 2 or 3 hours, but died within a week. Several mites survived in tubes refrigerated for an hour or less, that thrived and began to reproduce at the end of the week. Apparently, no egg resisted a 60' congelation. The use of temperature variation in the struggle against fungus-invading mites is discussed..

INTRODUCCION

Del orden Acarina, clase Arachnida, se conocían al menos 18.000 especies hace 40 años¹, cuando se estimaba que, en cualquier lugar de la zona tórrida,

podían haber entre 300 y 500 especies. En la zona tórrida no seca, como es la región de Caracas, podemos nosotros estimar la presencia de un número doble o triple.

En el manejo de las colecciones de hongos, sin embargo, sólo pocas especies de ácaros cobran importancia y sólo 2 géneros son mencionados con frecuencia: **Tirogliphus** y **Tarsonemus**^{2,3,4}. Poblaciones de estos 2 géneros han invadido muchas veces nuestros cultivos (Tarsonemus más que Tirogliphus), sobre todo durante la época de lluvias, cuando la

humedad relativa en el ambiente puede subir al 95%. En tal época son invadidos no solamente los cultivos mantenidos a temperatura ambiente (23-28° C), sino también los guardados a 20° C y a 100 C. Se impone así la necesidad de buscar y se ofrece la oportunidad de ensayar métodos para impedir o parar la invasión.

Hace aproximadamente 25 años uno de nosotros descubrió (sin pretender ser el primero) el efecto letal de la congelación sobre los ácaros y desde entonces ha venido empleando la temperatura de -12° C, vigente

Trabajo de la Sección de Micología. Instituto de Medicina Tropical y la Cátedra de Microbiología, Escuela 'Luis Razetti', Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Ap. 2109. El primer autor es profesor jubilado; el segundo autor es estudiante de medicina.

en el congelador de esta Sección de Micología. Efectos equivalentes obtuvo usando el congelador de neveras domésticas cuya temperatura encontró variar entre -1° C y -15° C. Sin embargo, no se había llegado hasta ahora, a averiguar en cuánto tiempo se obtiene el efecto letal (con el frío). La cría de ácaros en un laboratorio de micología es operación que requiere varias precauciones y siempre ocasiona riesgo de aumentar la población acarina en el ambiente. Aprovechando una de las periódicas interrupciones en las actividades académicas, hemos diseñado y realizado un experimento sencillo para detectar cuánto tiempo se necesita para suprimir los ácaros en un cultivo. En esta nota relatamos la técnica y los resultados.

MATERIAL Y METODOS

Se adoptó como objeto de estudio una población de ácaros, que habían recién invadido cultivos sembrados con muestra clínica en el laboratorio de uno de nosotros, situado en Caracas, durante la estación lluviosa de 1986. Examinados por microscopio a través del tubo con objetivo y ocular de aumento 10 cada uno, los ácaros mostraron la forma del género *Tarsonemus*. Había gran prevalencia de hembras sobre machos y numerosos huevos, que, por cierto, se ven increíblemente voluminosos cuando se comparan con el tamaño de las hembras adultas.

Como alimento de los ácaros, se tomó un cultivo de ***Penicillium glaucum***, que acababa de aparecer como contaminante de otra muestra clínica en el mismo laboratorio.

Como terreno de cultivo se usó lactritmel en tubos de 100 x 13 mm, taponeados con algodón, contenientes cada uno aproximadamente 3 mi— de terreno.

Para igualar las condiciones de la población de ácaros, se prepararon tubos-madres, sembrando dos tubos con fragmentos tomados de colonias de *P. glaucum* y de ácaros. El moho y los ácaros crecieron parejos

durante una semana. De ellos se tomaron fragmentos de tamaño aproximado igual para inocular 20 tubos nuevos, que también se dejaron incubar a temperatura ambiente (22-24° C) durante otra semana. Al final, estos 20 tubos fueron sometidos a microscopía y se encontró en ellos, además del vigoroso crecimiento de *P. glaucum*, una abundante reproducción de los ácaros. Se procedió entonces a la congelación, metiendo la gradilla que los llevaba en el centro de un congelador de 30 pies de capacidad. El termómetro medía entonces -12° C en el interior del congelador. A la media hora, se abrió el congelador y se sacaron 2 tubos, que fueron marcados I; a la hora y después de cada hora sucesiva, se sacaron sendos pares de tubos que fueron marcados II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX y X. Los tubos sacados del congelador fueron mantenidos a temperatura ambiente (22-24° C). Después de una hora, se empezó la observación microscópica a través del tubo. Tal observación fue proseguida durante casi todo el resto del día y repetida cada día por 1 semana. Cada vez se contaron 15 ácaros por tubo, anotándose los resultados con especial atención a la motilidad (vivos) o inmovilidad (muertos). Se consideró oportuno limitar a 15 el número de los ácaros leídos en cada tubo, para no prolongar demasiado el tiempo de microscopía y evitar de leer 2 o más veces el mismo animal que se hubiera desplazado.

Una semana. después de la congelación, los tubos que habían mostrado animales vivos fueron repicados a tubos vírgenes con el mismo terreno, para observar el ulterior crecimiento de *P. glaucum* y la eventual reproducción de los ácaros.

Sólo las primeras siembras fueron realizadas en el laboratorio. La segunda siembra, la incubación siguiente, la observación microscópica y la congelación fueron realizadas en la casa de habitación, para no poner ese enorme criadero de ácaros en la vecindad de los cultivos

clínicos. La temperatura vigente en la casa osciló entre 22° C y 24° C, mientras la humedad relativa oscilaba entre 80 y 90%.

RESULTADOS.

A la hora de ser sacados los tubos del congelador, todos los ácaros visibles estaban inmóviles. A las 2 horas más tarde, se vieron ácaros vivos en los tubos que habían permanecido en el frío durante media hora, dos horas y 3 horas. Signo de vida se consideró el movimiento. El movimiento consistía en cambios de posición de las patas, sobre todo, las delanteras, y la cabeza. Algunos ácaros de los tubos I y II también caminaban. El resultado del recuento inicial se puede ver resumido en el Cuadro I, que corresponde a las observaciones realizadas el mismo día de la congelación.

CUADRO I			
ACAROS SOBREVIVIENTES A LA CONGELACION			
Orden	Tiempo	30 leídos	
		vivos	muertos
I	30'	16	14
II	60'	20	10
III	120'	3	27
IV	180'	5	25
V	240'	0	30
VI	300'	0	30
VII	360'	0	30
VIII	429'	0	30
IX	480'	0	30
X	540'	0	30

En los días sucesivos, se observó ulterior disminución de los animales vivos, ninguna aparición de animales nuevos o deposición de huevos o apareamientos. Al día siguiente, en los tubos IV (3 horas de congelación vimos uno solo moviendo las partes anteriores, sin caminar; en los tubos III (2 horas) vimos 2 animales desplazarse lentamente.

El segundo día, no vimos ningún animal moviéndose en los tubos IV (3 horas); vimos uno solo moviendo las partes anteriores en los tubos III (horas); había varios vivos y caminando, pero la mayoría estaban muertos en los tubos I (30').

Igual quedó la situación hasta el cuarto día después de la congelación, cuando empezamos a ver mayor movimiento en los tubos I y II, donde aparecieron machos activos, algún apareamiento y pocos individuos jóvenes sólo en los días quinto y sexto. Los tubos con ácaros vivos fueron entonces repicados en otros tubos con el mismo terreno. A los 2 días, *P. glaucum* había crecido vigorosamente, aunque no se vieron ácaros. Estos aparecieron en tales tubos sólo a los 5-7 días.

COMENTARIO

Durante este sencillo experimento hemos constatado que:

- 1.- todos los ácaros *Tarsonemus*, habitantes de tubos con terreno lactritmel cultivado con *Penicillium glaucum*, murieron al ser mantenidos los tubos a -12°C por 4 horas o más;
- 2.- pocos ácaros de tubos mantenidos a la misma temperatura por 3 horas sobrevivieron para ir muriendo durante los 4 días sucesivos;
- 3.- lo mismo pasó con los ácaros mantenidos a -12°C por 2 horas.
- 4.- sobrevivieron indefinitivamente pocos ácaros mantenidos a esa temperatura por 1 hora o 30'.

Al no encontrar aumento de la población de los ácaros sobrevivientes en los tubos mantenidos a -12°C por menos de 3 horas, durante la semana siguiente al congelamiento, suponemos que los embriones de los huevos allí presentes habían quedado también todos muertos: en otras palabras, los huevos resultarían extintos más rápidamente que los adultos.

Nosotros no habíamos hecho observaciones formales antes de ésta

y sólo sabíamos por experiencia empírica que los ácaros morían al estar un día en el congelador a -12°C , pero solíamos (por mayor seguridad) dejar los materiales a esa temperatura durante varios días.

En la literatura a nuestro alcance hallamos 2 antecedentes en el uso del frío para combatir a los ácaros. De Clercq & De Vroey⁵ encontraron que, con el fin de aislar las especies queratinófilas según la técnica de Vanbreuseghem, era ventajoso congelar las muestras: En efecto, los ácaros quedaban eliminados, el número de especies aisladas era mayor y su conservación netamente mejor. Los autores belgas mantenían sus muestras a -25°C durante 5 días y quedaron deseosos de repartir el ensayo con tierra prelevada en países tropicales. Uno de nosotros, durante la década del '60, en el estudio de numerosas muestras de tierra venezolana, aplicó también el frío para matar los semovientes (lombrices, ácaros, insectos), congelando las muestras también a -12°C durante 1 a 7 días.

Gochenaur⁶, estudiando muestras de 29 suelos peruanos, las sometió a congelación a -7°C durante tiempo variable, no precisado, aunque no mayor de 18 meses; pero 4 muestras fueron olvidadas a temperatura ambiente (Madison, Wisconsin) y dieron una cosecha 10 veces menor que el promedio de las muestras refrigeradas.

Por otro lado, nosotros hemos comprobado por experimentos todavía inéditos que muchas especies de hongos patógenos resisten a la congelación a -12°C por largo tiempo (meses y años), cuando se encuentran mantenidos en cadáveres de animales infectados. La única especie que suele perecer en menos de 1 mes es ***Paracoccidioides brasiliensis***.

El empleo de las temperaturas altas ha sido también aplicado muy poco en la lucha contra los ácaros. Pietrini⁷ logró destruir ácaros y sus huevos sometiendo cultivos semise

cos al calentamiento por 4 a 12 segundos, en horno de onda corta, sin destruir los cultivos sobre los cuales crecían. Las especies probadas por Pietrini eran dermatófitos. Convendría probar con especies más delicadas y ver si se puede operar sobre cultivos no secos, porque, al momento de descubrir los ácaros en un tubo, hay que someter todo el lote o toda la colección al tratamiento acaricida, sin distinciones o demoras.

Nuestra experiencia en el uso de temperatura alta contra los ácaros se limita a una observación: Cultivos de *Coccidioides immitis* invadidos por ácaros y puestos a incubar a 38°C resultaron libres a la semana.

Hemos trabajado con una sola especie de ácaros. Es posible que otras presenten diferente resistencia a la congelación. Es cuestión de sorprender los invasores adecuados. Durante los últimos años sólo hemos recibido la visita de *Tarsonemus*.

Otro aspecto, que requiere cabal investigación, es el de la temperatura óptima de congelación, o sea, aquella temperatura generable en los congeladores de uso común en el laboratorio, que mate a todos los ácaros y sus huevos en un lapso compatible con las operaciones normales del laboratorio. En experimento piloto, no reportado en esta nota, después de 7 horas de congelación a -4°C , conseguimos muertos menos de la mitad de una población de *Tarsonemus* y, después de 48 horas de congelación a -1°C , conseguimos muertos aproximadamente la mitad de otra población de *Tarsonemus* criados y examinados bajo las mismas condiciones aquí descritas. Cabe pensar en la existencia de una temperatura mínima, necesaria para causar (¿mediante formación de cristales en células y tejidos?) daño irreversible e incompatible con la vida de los ácaros. No hemos podido aclarar esta duda, por carencia de aparatos capaces de generar temperaturas intermedias.

El valor teórico del limitado conocimiento adquirido con nuestro experimento es imponderable como el es valor de todo conocimiento teórico. El valor práctico creemos consiste en facilitar el manejo del laboratorio de micología. Ahora sabemos que la invasión es arrestada inmediatamente, sin notable trastorno en la marcha de los cultivos no contaminados. Basta poner los cultivos en congelador por la mañana para poderlos sacar por la tarde.

Por otro lado, la facilidad en suprimir el invasor no merma la

necesidad de vigilar para prevenir la invasión. Usualmente, tubo invadido es cultivo perdido.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Matheson R. Entomology for Introductory Courses. Comstock, Ithaca, New York, p. 21, 1948.
- 2.- Lacaz C.S. Micología Médica. Sao Paulo. p. 84, 1977.
- 3.- Popof I.S. Acaros en cultivos de hongos (ruso). Vestník Dermaloguii i Venereologuii. (3) 32-34, 1966
- 4.- Benedek T. Use of thymol as an acaricidal against infestation of fungus cultures and mycotheca with Acari (mites). Mycopath Myc Appl 1: 87-93, 1963.
- 5.- De Clercq D. & De Vroey Ch. Procédé favorisant l'isolement de champignons kératinophiles par la technique de Vanbreuseghem. Bull Soc Fr Mycol Méd. 10: 29-31, 1981.
- 6.- Gochenhaur S.E. Soil mycoflora of Peru. Mycopath Mycol Appl 42: 259272, 1970.
- 7.- Pietrini P: Les fours á micro-ondes, nouveau moyen de lutte contre les acariens mycophages. Bull Soc Fr Mycol Méd 12 :189-191, 1986.

REVISION DE LIBROS

MICOLOGIA MEDICA. Fungos, Actinomicetos e Algas de Interesse Médico. SARVIER, Sao Paulo, Brasil.

Carlos Da Silva Lacaz, Edward Porto, José Eduardo Costa Martins.

Es la octava edición revisada y ampliada, cubierta en cartón, 696 páginas; trae muy numerosas ilustraciones en blanquinegro y algunas en colores. Precio no indicado.

Aunque la presentación es parecida a la de la anterior edición, la presente tiene 170 páginas más que aquella. Todos los temas han sido puestos al día. Por ejemplo, la paracoccidiodosis ocupa 58 páginas y sus aspectos inmunológicos son tratados con gran amplitud. La riqueza iconográfica de esta obra es proverbial, aunque en esta edición la calidad de las

figuras ha bajado un poco junto con la calidad del papel.

Considero que todas las escuelas de medicina, las cátedras de dermatología y de microbiología y los micólogos médicos deberían tener este libro como texto de consultación. El estar escrito en portugués es razón demás para adquirirlo: Mientras se aprende micología, se familiariza uno también con las 50 palabras que separan aquel idioma del nuestro.

El prof. Lacaz y sus colaboradores merecen todo nuestro elogio y nuestra admiración por su persistente y bien logrado esfuerzo.

La dirección de la editora SARVIER es la siguiente: Rua Dr. Almancio Carvalho, 459. CEP 04012. Sao Palo, Brasil.

Dante Borelli