
Resistencia de algunos hongos patógenos a los vapores del formol

Carmen Marcano (*)

Guillermo Palacios (*)

Claudia Vivas (*)

(*) Sección de Micología, Instituto de Medicina Tropical, Universidad Central de Venezuela, Apartado 2109 Caracas - Venezuela

INTRODUCCION

El formaldehído o formol es un gas incoloro, de olor suyo género, que se vende comercialmente en forma de solución acuosa al 37-41%, llamada formalina.

La formalina en dilución al 10% en agua se usa comúnmente para preservar y fijar los tejidos frescos para estudio histológico, como preservativo de muestras biológicas y otros materiales orgánicos y en la preparación de vacunas. Se ha usado en fumigaciones agrícolas y en el tratamiento de las semillas para evitar la acción parasitaria de los hongos en plantas y animales, y desde mucho tiempo se ha venido utilizando para matar cultivos de hongos "peligrosos".

Standard y Kaufman (1982), reportan que el formaldehído, a concentraciones de 0,2 y 0,5% por 24 y 48 horas, es muy efectivo como fungicida en el tratamiento de cultivos de hongos patógenos *H. capsulatum*, *B. dermatitidis* y *C. immitis* para la preparación de antígenos, pero que, desafortunadamente, éstos pierden parte de su antigenicidad.

Fahmy y colab. (1983), reportan que la formalina al 10%, utilizada como fijador de los tejidos en patología, ejerce total actividad fungicida en los tejidos fijados por 5 minutos o más.

Wensley (1968), demostró que el efecto fungicida del formaldehído sobre conidias de hongos (*fusarium spp*) o sobre muestras de suelo infectado es mayor después de largos períodos de humedecimiento que después de períodos más cortos, lo que posiblemente sea debido a que el prehumedecimiento favorece la germinación de las clamidosporas, haciéndolas más susceptibles a la acción del fungicida.

Dennis & Gaunt (1974), utilizaron gases de formaldehído y formalina para tratar conidias de hongos y muestras de suelo provenientes de polleras y encontraron que el formaldehído gaseoso es más fungicida que la formalina. La exposición a 2 partes p/m de formaldehído por 24 horas mató el 99.99% de las conidias de cultivos puros, pero en las muestras de suelo la reducción de células viables no fue tan marcada debido probablemente a la incapacidad del gas para penetrar las capas más profundas. La exposición por 45 minutos a la formalina a concentraciones de 750-2000 partes p/m sólo retardó la germinación y la formación de colonias de varias especies de *Aspergillus*.

En 1982, Bartlett y colab., reportan el uso de formalina al 3% para la desinfección del suelo fuertemente infectado con *H. capsulatum* como medida para prevenir potencial brote de histoplasmosis entre los trabajadores y vecinos de una comunidad en Illionois. La cantidad de formalina utilizada en 3

días consecutivos (1 galón por pie cuadrado de suelo), se encontró que correspondía a 4 cm de lluvia y que penetraba a una profundidad de 19 cm, lo que se consideró suficiente para alcanzar a las posibles conidias de *H. capsulatum*. El procedimiento fue considerado exitoso ya que ningún caso de histoplasmosis fue reportado posteriormente.

En el laboratorio hemos venido utilizando la formalina 'al 10% humedeciendo los tapones de algodón, añadiéndola directamente a los tubos de cultivo o vertiéndola en las placas de Petri que contienen cultivos en lámina, dejándola actuar por 1 a 3 días antes de proceder a su manipulación.

El propósito del presente trabajo ha sido evaluar la acción de los gases de formaldehído sobre algunos hongos patógenos.

En este trabajo piloto se usó una sola cepa de cada una de las especies.

MATERIAL Y METODOS

1. **Cepas utilizadas:** Paracoccidioides brasiliensis 6029
Histoplasma capsulatum FMC 277
Coccidioides immitis FMC 196.

Se utilizaron repiques de las tres cepas sobre terreno sablac sin antibiótico, dejándolos crecer a temperatura ambiente (23-28°C) durante 1 mes (*P. brasiliensis*) o 15 días (*H. capsulatum* y *C.immitis*).

Trichophyton rubrum
Aspergillus fumigatus
Fusarium solani

Se utilizaron repiques de las tres cepas sobre terreno lactritmel, dejándolos crecer a temperatura ambiente durante 10 días.

2. Solución de formaldehído:

Se utilizó formalina (formaldehído solution 37-41 % de la casa Hopkin & Williams, Essex).

Para el experimento N° 1, se utilizó la formalina al 10% en agua.

Para el Experimento N° 2, se utilizó formalina pura (formaldehído 40%).

3. Experimento N° 1:

Los tubos de cultivo de cada una de las cepas fueron colocados sobre soporte, en frascos de boca ancha (capacidad 3650 ml) con tapa de rosca hermética en el fondo se colocaron 200 ml de formalina al 10% en agua;

se taparon los frascos y se dejaron a temperatura ambiente. Al día siguiente y cada uno de los días sucesivos, se sacó 1 tubo de cada una de las cepas. De cada tubo-cepa se hicieron repiques a 4 tubos de sablac (**P. brasiliensis**, **H. capsulatum** y **C. immitis**) ó 2 tubos de lactritmel (**Tr. rubrum**, **A. fumigatus** y **F. solani**) colocando trozos de la colonia en cada tubo. Los repiques fueron mantenidos a temperatura ambiente y observados a la semana, a las 2 semanas, al mes y a los 2 meses de sembrados.

4. Experimento N° 2:

Los tubos de cultivo de cada una de las cepas fueron colocados sobre soporte, en frascos de boca ancha de la misma manera que en el experimento anterior. En el fondo de los frascos se colocaron 200 ml de

formalina pura; se taparon y se dejaron a temperatura ambiente. De las cepas **P. brasiliensis**, **H. capsulatum** y **C. immitis** se sacaron 2 tubos los días 1, 2, 3, 5, 8 y 13 y de cada tubo se hicieron repiques a 3 tubos de sablac (6 tubos por cada una de las cepas) que fueron mantenidos a temperatura ambiente y observados a la semana, a las 2 semanas, al mes y a los 2 meses.

De las cepas **Tr. rubrum**, **A. fumigatus** y **F. solani**, se sacó 1 tubo de cada una de las cepas todos los días hasta el día 10, y de cada tubo se hicieron repiques a 2 tubos de lactritmel (2 tubos por cada una de las cepas) que fueron mantenidos a temperatura ambiente y observados a la semana, a las 2 semanas y al mes.

RESULTADOS

TABLA 1

Cepas \ Días	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
P. brasiliensis	++	++	++	++	--	++	+-	++	++	++	++	--
	++	++	--	+-	--	--	--	--	--	++	--	--
H. capsulatum	++	++	++	++	+-	+-	--	--	--	--	--	--
	++	+-	-	+-	--	--	--	--	--	--	--	--
C. immitis	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+-

Paracoccidioides brasiliensis se mantuvo vivo y creció bien en al menos 2 de los tubos sembrados, hasta el día 11 de exposición.

Histoplasma capsulatum se mantuvo vivo y creció en al menos 1 de los tubos sembrados, hasta el día 6 de exposición.

Coccidioides immitis creció en todos los tubos sacados durante los primeros 1 1 días y en 3 de los 4 tubos sembrados, hasta el día 12 de exposición

TABLA 2

Cepas \ Días	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Tr. rubrum	++	+-	--	--	--	--	--	--	--	--
A. fumigatus	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
F. solani	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++

Tr. rubrum dejó de crecer después de 2 días de exposición.

A. Fumigatus y **F. solani** permanecieron vivos y crecieron hasta los 10 días de exposición.

2. Experimento N° 2: Formalina al 40

TABLA 3

Cepas \ Días	Días					
	1	2	3	5	8	13
<i>P. brasiliensis</i>	+++ +++	+-- ++-	+-- +--	--- ---	--- ---	--- ---
<i>H. capsulatum</i>	+ +- + +-	+-- +--	+ - + +	--- ---	--- ---	--- ---
<i>C. immitis</i>	+++ +++	+-- ++-	+-- + +	--- ---	--- ---	--- ---

P. brasiliensis, *H. capsulatum* y *C. immitis* se mantuvieron vivos y crecieron en los tubos sacados después de 1 día y en parte de los tubos hasta el tercer día de exposición. Ninguna de las tres cepas creció después de 5 días de exposición.

TABLA 4

Cepas \ Días	Días									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>Tr. rubrum</i>	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
<i>A. fumigatus</i>	++	--	++	+ -	+ -	--	--	--	--	--
<i>F. solani</i>	++	++	--	++	--	--	--	--	+ -	--

Tr. rubrum no creció en ninguno de los tubos sembrados desde el primer día de exposición.

A. fumigatus dejó de crecer a partir del 69 día de exposición.

F. solani se mantuvo parcialmente vivo hasta el 99 día de exposición.

COMENTARIOS

Cuando se utilizó la formalina al 10%, *Tr. rubrum* resultó ser el más sensible a la acción de los vapores del formo), dejando de crecer después de 2 días de exposición. *H. capsulatum* resultó ser más sensible que *P. brasiliensis* y *C. immitis*. A esta concentración, *P. brasiliensis* sobrevivió hasta el día 11 de exposición, mientras que *A. fumigatus* y *F. solani* sobrevivieron por más de 10 días y *C. immitis* por más de 12 días de exposición.

Cuando se utilizó la formalina pura (40%), *Tr. rubrum* no sobrevivió desde el primer día de exposición; *P. brasiliensis*, *H. capsulatum* y *C. immitis* dejaron de crecer entre el 49 y 59 día; *A. fumigatus* dejó de crecer a partir del 69 día y *F. solani* se mantuvo vivo hasta el 99 día de exposición. La ausencia de crecimiento entre el 59 y 89 día de exposición podría deberse al hecho de que sólo se tomó parte de la colonia del hongo para ser transplantada, pu-

diendo haber quedado células viables en el fondo, que sí crecieron al 9^o día de exposición.

La acción del formo) sobre el protoplasma de los hongos podría explicarse por su acción coagulante sobre las proteínas. Es de suponer que *Coccidioides immitis*, *Aspergillus fumigatus* y *Fusarium solani* ofrecen condiciones que les permiten resistir la acción de anti-sépticos comunes así como otras adversidades del ambiente. En los cultivos, las clamidosporas, por la composición y el espesor de su pared, podrían resistir mejor la penetración del formo) y quizás, la acción de los gases sea mayor sobre la superficie de los cultivos que en la parte más profunda del micelio cuando se utilizan cultivos sobre medios sólidos, como ha sido señalado por Dennis & Gaunt (3). Mi hipótesis sobre este fenómeno es que la concentración del formaldehído tiende a equilibrarse desde la solución original depositada en el fondo del recipiente al terreno contenido en los tubos, cuya fase líquida va absorbiendo el gas len-

tamente por la presencia de la fase gel representada por el agar. Por esto el efecto letal del formo) se manifiesta más tardíamente en la parte sumergida que en la parte aérea de los cultivos.

La poca resistencia de *Tr. rubrum* a los vapores del formo) es un indicio de que éste puede ser efectivo para la esterilización de fomites en el control de la tiña humana, que viene siendo causada cada día más por esta especie.

En el laboratorio, los cultivos de hongos patógenos considerados como "peligrosos" deben ser tratados con precaución y creemos que se debe prolongar la exposición al formo) (a máxima concentración) por más tiempo del que suele considerarse suficiente.

Habiéndose usado una sola cepa de cada especie estudiada, los resultados son solamente indicativos, no definitivos. Es deseable repetir estos experimentos usando mayor número de cepas e incluyendo otras especies.

BIBLIOGRAFIA

1. Bartlett, P.C., Weeks, R.J. & Ajello, L. Decontamination of *Histoplasma capsulatum*-Infested bird roost in Illinois. Arch. Environm. Hlth., 37: 221-223, 1982.
2. Booth, C. The Genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England, pp 11-31, 46-49, 1971.
3. Dennis, C & Gaunt, H.: Effect of Formaldehyde on Fungi from Broiler Houses. J. Appl. Bact., 37:595-601, 1974.
4. El-Abayad, M.S., Ismail, LK & Al-Meshhadani, S.A.: Effects of some biocides on *Fusarium oxysporum* formae specialis causing cotton and tomato wilts in Egypt. Trans. Br. Mycol. Soc., 80:283-287, 1983.
5. Fahmy, A., Flournoy, D.J. & Steward, V.V.: Effect of formalin on the survival of systemic fungi in tissue. Mycopath., 82: 175-178, 1983.
6. Goodman & Gilman. Bases farmacológicas Hispanoamericana, México. 1957.
7. Schmorl, G.: I metodi della indagine istopatologica. Unione Tipografica. Edit. Torinese, Torino, VIII. 1930.
8. Speakman, J.B & Kruger, W.: A comparison of methods to surface sterilize wheat seeds. Trans. Br. Mycol.Soc., 80:374-376, 1983.
9. Standard, P.G. & Kaufman, L.: Safety considerations in Handling Exoantigen Extracts from Pathogenic Fungi. J. Clin. Microb., 15:663-667, 1982.
10. Tey., C.C & Wood, R.K.S.: Effects of various fungicides in vitro on *Phytophthora palmivora* from cocoa. Trans. Br. Mycol. Soc. 80:271-282, 1983.
11. Wensley, R.N.: The effect of pre-wetting naturally infested soils on destruction of the muskmelon wilt fungus by formaldehyde. Cand. J.Microb., 14:309, 1968.