

## Tesis de Posgrado

# Actividad bacteriofágica durante el proceso de digestión de barro cloacal

Tabacman, Jaime

1944

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Química de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

#### Cita tipo APA:

Tabacman, Jaime. (1944). Actividad bacteriofágica durante el proceso de digestión de barro cloacal. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_0366\\_Tabacman.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0366_Tabacman.pdf)

#### Cita tipo Chicago:

Tabacman, Jaime. "Actividad bacteriofágica durante el proceso de digestión de barro cloacal". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1944.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_0366\\_Tabacman.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0366_Tabacman.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE BUENOS AIRES**  
**Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales**

**ACTIVIDAD BACTERIOFAGICA DURANTE EL PROCESO DE**  
**DIGESTION DE BARRO CLOACAL**

**Tesis**  
**Para optar al título de Doctor en Química**

**por**  
**Jaine Tabacman**

*Tesis:* 366



- 1944 -

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

**Padrino de tesis**

**Profesor Doctor Rogelio A. Trelles**

Agradezco al profesor doctor Rogelio A. Trelles el patrocinio de la tesis y las facilidades otorgadas para su ejecución en los Laboratorios de Obras Sanitarias de la Nación.

Expreso mi reconocimiento al doctor Raúl Ferramola por haberme guiado en la realización de este trabajo.

## PLAN DE TESIS

### ACTIVIDAD BACTERIOFAGICA DURANTE EL PROCESO DE DIGESTION DEL BARRO CLOACAL

Introducción : A) Descripción de los procesos de digestión de barro cloacal.

B) Presencia y actividad de bacteriófagos en el líquido y en el barro cloacal.

Propósito del trabajo : Contribución al conocimiento de los fenómenos de orden biológico que se producen durante el proceso de digestión de barros cloacales.

Plan : A) Estudio de la técnica para la investigación de bacteriófago en barro cloacal.

B) Digestión experimental (a 37° y 55°C) del barro obtenido por sedimentación del líquido cloacal de Buenos Aires.

C) Investigación de bacteriófago para bacterias del grupo coli-salmonella-disentérico, en barro fresco y durante diversos períodos de su digestión.

D) Supervivencia de bacterias del grupo coli-salmonella en el barro en digestión.

E) Determinación cuantitativa aproximada de bacteriófagos en la fase líquida y sólida del barro.

## I) INTRODUCCION

### 1) El proceso de digestión del barro cloacal.

La digestión del barro cloacal es un proceso mediante el cual se transforma un material ofensivo e inestable en otro suficientemente inofensivo y estable, que ocupa además un volumen menor y está en condiciones óptimas para el secado al aire.

El barro cloacal resulta de la sedimentación de las materias suspendidas en el líquido cloacal, o el que se acumula como resultante de los procesos de purificación del líquido cloacal (precipitación química, barros activos, etc.). En este trabajo nos referiremos exclusivamente al barro que se obtiene por sedimentación directa del líquido cloacal fresco.

En la ciudad de Buenos Aires el líquido cloacal no recibe ningún tratamiento de purificación, sino que se lo descarga directamente en el Río de la Plata, frente a Berazategui, a 900 metros de la costa, previo paso por unas rejas para interceptar los cuerpos grandes que lleva en suspensión. Este líquido, descargado en el río, está constituido en su mayor parte por materias fecales disgregadas, orinas y líquidos domésticos provenientes del lavado de alimentos, ropas, habitaciones, etc. y en menor proporción agua de lavado de calles. (\*)

En las poblaciones densas y con un curso de agua pobre, a los efectos de evitar el peligro que supondría arrojar al agua un material tan contaminado y ofensivo como el líquido cloacal, éste es previamente sometido a un tratamiento de purificación. Por lo general el líquido cloacal pasa primero a través de unas rejas para retener los materiales grandes que arrastra (tra -

---

(\*) A.Bado y V.Bernaola.- Anales de la Asoc.Quím.Argentina 15, 105, 1927.

pos, trozos de madera, etc.) y que podrían dañar las bombas o atas-  
car los canales; luego sigue a los desarenadores donde se eliminan  
los materiales fácilmente sedimentables (generalmente arena y  
otras sustancias minerales); y llega a los tanques de sedimenta-  
ción, de diversos tipos, donde tiene lugar la sedimentación de la  
materia en suspensión en el líquido, principalmente materia orgáni-  
ca, formándose así el barro cloacal que ha de ser digerido (sea di-  
rectamente o mezclado con el proveniente de otros procesos de puri-  
ficación), para su disposición final en los lechos de secado. Esta  
sedimentación puede ser facilitada con coagulantes químicos (cal,  
cal con  $SO_4Fe$  o alumbre).

El barro digerido y secado se utiliza para relleno -  
de terrenos o como fertilizante, o puede ser incinerado.

El efluente de los tanques de sedimentación es, a su  
vez, estabilizado por un proceso biológico aeróbico que se lleva a  
cabo, ya sea en los lechos bacterianos (lechos de contacto y fil-  
tros percoladores) o mediante el proceso de los barros activados.

El barro cloacal obtenido en los tanques de sedimen-  
tación es un material complejo constituido esencialmente por agua  
(90-95 %), compuestos inorgánicos y sobre todo orgánicos (hidratos  
de carbono, grasas y proteínas) y un gran número de bacterias y -  
protozoarios.

El barro cloacal crudo, es una masa semilíquida, de  
color gris, y con un pronunciado olor fecal, que, por digestión se  
transforma en un residuo negro, granular, semejante al humus, con  
leve olor a alquitrán, y que puede ser rápidamente separado, por -  
drenaje, del líquido al cual está asociado.

La digestión del barro cloacal es un proceso biológi-  
co llevado a cabo por microorganismos anaerobios que originan la -  
licuación y gasificación de la materia orgánica, en ausencia de -

oxígeno libre. Esta digestión, en la práctica es llevada a cabo ya sea en el mismo tanque donde sedimentó el barro, junto con el líquido cloacal sobrenadante, como ocurre en los tanques sépticos - (donde se va acumulando y digiriendo el barro, que no es retirado hasta tanto no esté completamente digerido) o en una cámara de digestión acoplada al tanque de sedimentación, como en el tanque Imhoff (en el que tiene lugar la digestión del barro separado del líquido), o finalmente en un tanque separado de digestión de barro. En realidad los tanques sépticos han sido desplazados por los métodos de digestión separada de barro.

En el proceso de digestión se suelen distinguir dos fases o etapas : una primera etapa, ácida y una segunda, alcalina, a las que Imhoff <sup>(1)</sup> designó como "fase pútrida" y "fase inodora" respectivamente, términos que luego cambió por "digestión ácida" y "digestión metánica".

El barro crudo, cuyo pH suele oscilar alrededor de 6,0, al comenzar a digerir sufre un descenso rápido en su pH, hasta alcanzar un valor cercano a 5,0. Esta disminución del pH sería causada por la producción de ácidos orgánicos que resultarían de la descomposición de carbohidratos y grasas, especialmente ácidos grasos de bajo peso molecular. Tiene lugar así, la etapa ácida de la digestión, que se caracteriza por un gran desprendimiento de gas (que da lugar a que la mayor parte de los sólidos floten) y un fuerte y desagradable olor. El líquido adquiere un aspecto lechoso y los sólidos una consistencia viscosa. El gas desprendido contiene de 20 a 50 % en volumen de  $\text{CO}_2$ , y de 50 a 70 % de  $\text{CH}_4$ .

La reacción ácida de esta primera etapa, no es favorable para la buena digestión del barro, la cual tiene lugar, sobre todo, durante la "fase alcalina" o "no pútrida" o "digestión metánica". Durante esta etapa aumenta el pH hasta alcanzar un valor



cercano a 8,0, como resultado de la destrucción de parte de los ácidos orgánicos y neutralización del resto por las sustancias alcalinas (especialmente  $\text{NH}_3$ ) producidas por descomposición de las sustancias proteicas. Esta etapa se caracteriza por un gran degrendimiento de  $\text{CH}_4$  y por la mayor velocidad de descomposición de la materia orgánica.

De modo que para conseguir una buena y rápida digestión del barro, hay que tratar de mantener una reacción alcalina durante la misma. Para ésto se recurre al agregado de cal u otro material alcalino, pero sobre todo a la siembra del barro crudo con barro que está en la etapa alcalina de la digestión o sea "barro maduro". Este barro digerido, además de regular la reacción de la mezcla en digestión, provee la flora necesaria para llevar a cabo la digestión. Se ha observado que el agregado de cal no es siempre beneficioso, por lo cual se prefiere el agregado de una conveniente proporción de barro maduro.

O'Shaughnessy (2) estableció que la mejor siembra es de una parte de barro maduro para cuatro partes de barro crudo.

Inhoff (3) recomendó la mezcla de una parte de sólidos frescos con 30 partes de barro maduro.

Rudolfs, Heukelekian y Zeller (4) encontraron que a  $21^\circ\text{C}$ , el agregado diario de dos partes de sólidos frescos secos a 98 partes de barro digerido seco da lugar a una buena digestión.

Fischer (5) señaló como conveniente una cantidad de barro maduro igual a 20 veces el peso del barro crudo añadido diariamente, sobre la base de sólidos secos.

La experiencia mostró que es mejor basar la proporción de siembra sobre la materia volátil que sobre los sólidos, ya que el contenido de cenizas de los barros crudos y maduros de dife

rentes lugares varía.

Zack y Edwards (6) sostuvieron que la adición de una parte de barro maduro a dos partes de sólidos frescos, basado en la materia volátil, es usualmente satisfactorio. Esta es la mezcla generalmente adoptada en las experiencias de laboratorio.

En cuanto a la edad y condiciones del barro maduro que se ha de usar en la siembra, Rudolfs (7) estableció que el barro maduro no conserva indefinidamente su valor, y no deberá ser de más de dos a tres meses de edad.

Zack y Edwards (6) recomendaron el empleo de barro sembrante en un estado activo de gasificación.

Heukelekian (8) encontró que las propiedades sembrantes del barro eran mejores cuando la descomposición era justamente completada y aún alrededor de un mes después, y que permaneciendo el barro por períodos mayores que un mes, luego de completada su digestión, empeora su valor sembrante.

Keefer y Kratz (9), en cambio, observaron que las propiedades sembrantes del barro digerido eran prácticamente independientes de su edad.

Un factor importante a tener en cuenta para conseguir una buena digestión es el valor del pH.

Rudolfs (10) consideró como óptimo un valor del pH de 7,3.

Fair y Carlson (11) indicaron conveniente un valor de pH de 6,8 durante la etapa inicial de la digestión, que deberá ser aumentado a 7,2 o algo más durante la etapa final.

Fischer (5) recomendó para una buena digestión mantener el pH entre 7,3 y 7,6.

Heukelekian y Heinemann (12) encontraron que el óptimo de pH para el desarrollo de las bacterias productoras de metano era muy cercano a 7,0.

Otro factor importante en la digestión del barro es la temperatura, que está estrechamente vinculada a la velocidad de digestión. Se han distinguido dos zonas de temperatura de digestión : la zona mesofílica o de baja temperatura (de 20 a 37°C) y la zona termofílica o de alta temperatura (de 45 a 65°C), en la que la digestión es más rápida. En general se ha observado que, dentro de cada zona, un aumento de la temperatura origina un aumento de la velocidad de descomposición de la materia orgánica, habiendo entre una y otra zona una región de menor actividad.

Baity (13) determinó el tiempo requerido para la digestión de sólidos frescos sembrados, a distintas temperaturas, y comprobó que a 10°C el tiempo de digestión era de 270 días; a 20°C, 70 días; a 25°C, 54 días y a 37°C, 58 días.

En experiencias hechas en 1927 para determinar el efecto de la temperatura sobre la digestión del barro cloacal, Rudolf (14) comparó la digestión de sólidos frescos no sembrados (barro crudo) a 10°, 18°, 24°, 29°,5 y 35°C con el siguiente resultado :

Temperaturas :	10°	18°	24°	29°,5	35°
Tiempo de digest.(días)	360	200	142	61	89

Así estableció que el óptimo de temperatura de digestión en la zona mesofílica es de alrededor de 28°C.

En un estudio sobre la digestión termofílica de sólidos cloacales, Heukelekian (15) determinó que la digestión es ligeramente más rápida a 55-60° que a 45-50°C; pero que encima de 60° hay un retardo. A 50°C el tiempo de digestión de mezclas de dos -

partes de sólidos frescos con una parte de barro maduro, sobre la base de la materia volátil, fué de 14 días; a 55° fué de 11 días y a 60°, 12 días. A 22°C, en cambio, el tiempo de digestión fué de 35 días. Sin inoculación de barro digerido, pero ajustando el pH inicial con cal, a 50° obtuvo un tiempo de digestión de 25 días. Comparando la digestión termofílica (a 50°) con la no termofílica (a 22°), comprobó el desprendimiento de una mayor cantidad de gas por gramo de materia volátil cruda, y una mayor reducción de materia volátil y de nitrógeno bajo condiciones termofílicas.

Marshall (16) estableció que el óptimo de temperatura para la digestión es de alrededor de 27°C y que la digestión se acelera sembrando los sólidos frescos antes que se desarrolle la acidez.

Rudolfs y Heukelekian (17) comprobaron que el óptimo de temperatura para el rango termofílico es de 45-55°C y que para estas temperaturas es mejor, para sembrar, un barro producido en condiciones termofílicas. Con mezclas de barro fresco y barro maduro termofílico, en la proporción de 2:1, basado en la materia volátil, el tiempo total de digestión fué de 18 á 20 días. A 28°C (que es considerado como el óptimo para la digestión mesofílica) el tiempo requerido para completar la digestión de mezclas semejantes, fué de alrededor de 30 días.

Rudolfs (18) estableció que el grupo termofílico de organismos destruye la materia orgánica más rápidamente y en mayor proporción que el grupo no termofílico. Así, bajo condiciones ordinarias de temperatura (28°C) del 50 al 60 % de la materia volátil es descompuesta en 25 a 30 días, mientras que alrededor de 70 a 75 % es destruída a 49°C en 1 á 3 días. Además, el óptimo de pH para el rango termofílico estaría entre 7,8 y 8,2.

Rudolfs y Heukelekian (19) en experiencias para cono

cer el efecto de la temperatura sobre la digestión del barro entre  $5^{\circ}$  y  $70^{\circ}\text{C}$ , encontraron que, el óptimo para la digestión a baja temperatura, fué de alrededor de  $28^{\circ}\text{C}$ , mientras que el óptimo para la digestión termofílica pareció estar alrededor de  $55^{\circ}\text{C}$ . A  $40-45^{\circ}\text{C}$  el tiempo requerido para la digestión de barro sembrado fué de 42 a 43 días; á  $55^{\circ}\text{C}$  alrededor de 8 días, a  $70^{\circ}$ , 40 días y a  $28^{\circ}\text{C}$  alrededor de 30 días.

Experiencias hechas por Keefer y Kratz (9) en 1931, indicaron una más rápida digestión a  $28^{\circ}\text{C}$  que a  $21^{\circ}\text{C}$  y posteriores experiencias, en 1933 (20), con mezclas de dos partes de barro fresco y una parte de barro maduro, basado en la materia volátil, demostraron que el barro digiere algo más rápidamente a  $37^{\circ}\text{C}$  que a  $28^{\circ}\text{C}$ . El barro digerido a  $37^{\circ}\text{C}$  requirió desde 5 a 10 días menos de tiempo para digerir que el barro incubado a  $28^{\circ}\text{C}$ .

Mediante experiencias hechas en Aurora (Illinois), Fischer (21) comprobó que las pruebas de digestión a  $54^{\circ},4$  no resultaron más rápidas que a  $32^{\circ},2$ .

Heukelekian (22), en ensayos sobre la digestión de sólidos entre el rango termofílico ( $50$  a  $55^{\circ}\text{C}$ ) y el no termofílico ( $28^{\circ}\text{C}$ ), encontró que a medida que la temperatura aumentó sobre  $28^{\circ}\text{C}$  y hasta que el rango termofílico es alcanzado, el tiempo de digestión no es ni aumentado ni disminuido. Además, estableció un tiempo de digestión a  $25^{\circ}\text{C}$  de 30 días; a  $28^{\circ}$ , de 25 a 30 días y a  $22^{\circ}$ , de 35 días.

Fair y Moore (23) señalaron cuatro distintas zonas de actividad : 1) zona criofílica : debajo de  $10^{\circ}\text{C}$ ; 2) zona de temperatura moderada; entre  $10^{\circ}$  y  $28^{\circ}\text{C}$ ; 3) zona intermedia : de  $28^{\circ}$  a  $42^{\circ}\text{C}$ ; 4) zona termofílica : encima de  $42^{\circ}\text{C}$ . Indicaron (24), además, que el óptimo de temperatura para la digestión en la zona no termofílica es de alrededor de  $36^{\circ},6$  y obtuvieron un tiempo de

digestión de 22,7 días a 40°C y de 46,6 días a 20°C. Para la zona termofílica observaron que el óptimo es de alrededor de 53°,30 - con un período de digestión de aproximadamente 8 días.

Heukelekian y Heinemann (12) indicaron que el óptimo de temperatura para la digestión mesofílica es de 28° a 35°C.

En cuanto al criterio que se sigue para dar por finalizada una digestión de barro, Neave y Buswell (25), buscando un método simple para determinar cuando un barro dado está "maduro" o suficientemente digerido para ser colocado sobre el lecho de secado, encontraron que el empleo de la determinación de la materia volátil (pérdida en peso a 900°C) y del carbón fijo, para distinguir entre barro fresco y digerido, no parece ser practicable. - Sin embargo, son datos útiles en un estudio detenido sobre el carácter del barro, y habría aún posibilidad de que los valores así obtenidos pudiesen estar relacionados con la madurez del barro. - Por lo pronto, el barro crudo contiene más materia volátil y menos carbón fijo que el barro digerido.

Según Marshall (16), la digestión completa se evidencia ópticamente por cesación de la gasificación, y analíticamente por determinaciones de materia volátil y ceniza, antes y durante la digestión. Si bien estos datos varían en cada barro, el por - ciento de ceniza en los sólidos secos luego de la digestión es generalmente más que dos veces de lo que es antes de la digestión.

En experiencias con barro de Plainfield conteniendo 75 % de materia volátil, Heukelekian (8) comprobó que el óptimo - de digestión era alcanzado cuando el contenido de ceniza llegaba a alrededor de 45-50 %, o sea cuando se obtenía una reducción de la original materia volátil de alrededor de 35 %.

Pearson y Buswell (26) establecieron que el conteni - do de cenizas y sólidos de un barro digerido puede ser satisfacto

riamente tomado como una indicación de madurez, pero ambos datos también dependen de otros factores, y por consiguiente no son de aplicación general.

Bach (27) estableció, que, en general, la digestión de alrededor del 50 % de la materia orgánica es el máximo práctico, ya que la reducción de la mitad del total de la materia orgánica cumple una casi completa eliminación de la materia objetable, una substancial disminución del volumen del barro y una gran mejora en la cualidad secante del barro.

El estudio microbiológico de la digestión anaeróbica del barro, no obstante las numerosas observaciones, dista mucho de estar completo. (\*) Winslow y Belcher (28) estudiando el curso de 15 grupos de bacterias durante el almacenamiento del líquido cloacal, encontraron que en ningún momento abundaron los anaerobios obligados, predominando en cambio los anaerobios facultativos al cabo de 48 horas. Los grupos encontrados más representativos, fueron : cocos, chromogenos, grupo del B. subtilus, grupo de Bact.coli, grupo de Bact. aerógenes y grupo de Bact. rhinoscleromatis.

Gaub (29) estudió los organismos presentes en barro digerido mientras eran retirados para el secado y observó que el 80 % de los aerobios y el 60 % de los anaerobios encontrados pertenecían al grupo intestinal, mientras que el 57,9 % de los aerobios y el 40 % de los anaerobios licuaban gelatina.

Hotchkiss y Murray (30), con material recogido de un tanque Imhoff de la planta de Plainfield, observaron que las bacterias principales presentes en el barro, y que producen las enzi

---

(\*) A.M. Buswell : "The chemistry of Water and Sewage Treatment".

mas responsables de la descomposición hidrolítica de los materiales de la cámara de digestión, pueden dividirse en seis grupos : 1) bacterias que atacan proteínas complejas, tales como albúmina de huevo coagulada, y producen compuestos solubles; 2) las que atacan proteínas complejas tales como la gelatina y causan licuación; 3) las que atacan proteínas solubles, como peptona, y las descomponen con formación de  $\text{NH}_3$ ; 4) bacterias que dan sulfuros como productos de proteolisis; 5) bacterias denitrificadoras y 6) bacterias nitrificadoras.

Hotchkiss (31) no encontró ninguna notable acción selectiva en los tipos de bacterias que componen la flora de la cámara de digestión de los tanques Imhoff. Observó que los organismos nitrificadores y oxidantes de S no son eliminados en la cámara de digestión.

Según Schaetzle (32), las bacterias que causan la gasificación y licuación de la materia orgánica del barro son de dos distintos tipos, y los mejores licuadores son no formadores de gas. La licuación es cumplida, sobre todo, por aerobios, de los cuales el *B. cereus* es aparentemente el que predomina y el de mayor rapidez en la acción. La gasificación es probablemente debida a anaerobios del tipo que produce gas y coagula la leche, siendo la reacción muy similar a la del *B. welchii*.

Greer (33) estableció que el barro contiene más organismos anaeróbicos que el líquido cloacal, y que de los anaerobios estudiados el *Cl. welchii* resultó ser el más numeroso, siguiéndole el *Cl. sporogenes*, *Cl. tetani* y *Vibrión séptico*.

Heukelekian (34) consideró que el grupo *B. coli* es el principal responsable del aumento de acidez que experimentan los sólidos cloacales frescos al comienzo de la digestión, debido a que descomponen los carbohidratos, dando lugar, así, a una alta



ácidez que a su vez restringe su propio desarrollo.

Ruchhoft, Kalles y Edwards (35) digirieron a 15° y 25°C seis barros, extrayendo barro activado, sólidos frescos y cuatro diferentes mezclas de los dos y estudiaron los cambios en la población bacteriana durante el curso de la digestión, observando la variación en el recuento total en placas, de formadores de ácido y gas de caldo glucosado, licuadores de gelatina y espores anaeróbicos. En general el número de bacterias aumentó durante 10 ó 15 días hasta que un equilibrio fué alcanzado, luego de lo cual comenzó una declinación que continuó durante todo el período práctico de digestión.

Heukelekian Y Heinemann (36) usando un medio modificado de Barker determinaron el número de bacterias productoras de metano presentes durante el curso de la digestión de sólidos sembrados, sólidos frescos alcalinizados con cal y sólidos frescos sin tratar. Los resultados mostraron que los organismos capaces de producir metano del acetato de calcio, butirato y alcohol etílico en medio sintético, estaban presentes en los sólidos cloacales en digestión y que su número era un índice del curso de la digestión. El número de dichas bacterias resultó ser algo más alto en barro maduro que en sólidos frescos. Se encontraron además mucho más organismos productores de metano en la fase del barro que en la fase líquida.

---

## 2) El bacteriófago : su naturaleza

El bacteriófago es el agente o sustancia que causa - la lisis transmisible de las bacterias.

Al fenómeno de la bacteriolisis se lo conoce también con el nombre de "fenómeno de Twort-d'Herelle" o "fenómeno de d' Herelle", ya que es a estos dos investigadores a quienes se debe el descubrimiento del agente responsable de la lisis bacteriana.

Twort (37), en 1915, inoculando tubos de agar con vacuna glicerizada de ternero, luego de incubación a 37° por 24 horas, observó la aparición de áreas transparentes, y que si se sembraban micrococcos sobre la superficie de ese medio, algunas de las colonias se tornaban vítreas y transparentes. Cuando un cultivo puro de micrococo blanco, aislado de la vacuna, era tocado con una pequeña porción de la colonia vítrea, en el punto tocado comenzaba a desarrollarse una zona transparente o vítrea que gradualmente se extendía sobre todo el cultivo. Examinando esas áreas vítreas, Twort observó pequeños gránulos que se tiñeron con el rojo Giemsa. El material transparente retuvo su actividad por calentamiento a 52°C, pero calentado a 60°C por una hora pareció destruirse; tuvo además acción, pero mucho menor, sobre *Staphylococcus aureus* y *albus* aislados de forúnculos humanos. Sin definir se en forma categórica sobre su naturaleza, Twort se inclinó a creer que el material activo transparente es producido por el micrococo mismo, y ya que lo conduce a su propia destrucción y puede ser transmitido a cultivos frescos sanos, debe ser considerado como "una aguda enfermedad infecciosa de los micrococcos".

D'Herelle (38), en 1917, de las deyecciones de diversos sujetos convalescientes de disentería bacilar, y en un caso de la orina, aisló un "microbio invisible" dotado de propiedades

antagónicas contra el bacilo de Shiga. Una pequeña cantidad de un filtrado activo, agregado sea a un cultivo en caldo de bacilos de Shiga, sea a una emulsión de los mismos en caldo o en agua fisiológica, provocó la detención del desarrollo y la muerte de los bacilos luego de lisarlos. Esta acción se transmitió indefinidamente a otros cultivos de bacilos de Shiga.

Continuando con sus investigaciones, d'Herelle (39) hizo ensayos de filtración a través de membranas de colodión de diferentes durezas, determinando que el diámetro del microorganismo debía ser aproximadamente igual a la de una molécula de albúmina. Según d'Herelle se trataría de un microorganismo perteneciente a un género nuevo, para el cual propuso primero el término de "Bacteriophagum", siendo el germen encontrado en el intestino de los disentéricos, un "Bacteriophagum intestinale". Más tarde adoptó el término de Bacteriófago, considerándolo como un virus ultramicroscópico, parásito de las bacterias. Para d'Herelle<sup>(40)</sup>, la naturaleza viviente del bacteriófago está demostrada por su poder de adaptación y de asimilación, en un medio heterogéneo.

Kabéshima (41), en 1920, se opuso a la concepción de d'Herelle sobre la naturaleza viviente del principio bacteriófago. Considerando que una cantidad extremadamente mínima del principio bacteriolisante bastan para disolver en un lapso muy corto una cantidad relativamente grande de bacilos, y que además dicho principio no pierde su poder cuando se lo calienta durante una hora a 70° y que recién se vuelve inactivo a los 75°, llegó a la conclusión de que el principio bacteriolisante es un catalizador al que llamó "fermento de inmunidad bacteriolisante" y que podría emplearse en la práctica como terapéutico y como profiláctico. Según Kabéshima, como consecuencia de la reacción contra la invasión de los bacilos patógenos, cierta glándula o los leucocitos en el tubo intestinal segregarían una clase de catalizador (principio bac

teriolisante o bactericida) que activaría una prodiastasa inactiva del cuerpo del bacilo, que produciría así una diastasa activa, que daría lugar a la autólisis de la bacteria.

Bordet y Ciuca <sup>(42)</sup> constataron que, el exudado peritoneal, muy rico en leucocitos, de un cobayo que ha recibido con algunos días de intervalo 3 o 4 inyecciones intraperitoneales de B.coli, agregado al microbio normal de la misma especie lo modifica confiriéndole un poder autolítico muy pronunciado, transmisible de cultivo en cultivo. El principio activo resistió un calentamiento de 60-65°C. Un cc de cultivo lisado, esterilizado a 58°C introducido en el peritoneo de un cobayo que acaba de recibir en esa región una inyección de coli normal, en dosis que mata un t<sub>u</sub>gigo en 8 horas, permitió al animal sobrevivir. Estos investigadores <sup>(43)</sup> suponen que el fenómeno de d'Herelle resulta de una actividad particular de los exudados leucocitarios, que da lugar, entre los microbios, a una "viciación nutritiva hereditaria", consistente en la producción, por los mismos, de una clase de fermento lítico capaz de difundirse en el líquido ambiente y de actuar de la misma manera sobre los microbios normales de la misma especie.

Bablet <sup>(44)</sup> teniendo en cuenta que el principio bacteriófago de d'Herelle cultiva en serie a expensas de bacilos vivos, que no se desarrolla en medio estéril (caldo), ni en presencia de antisépticos (CHCl<sub>3</sub>, FNa), que pierde su actividad en la glicerina, llegó a la conclusión que se trataría de un ser vivo que ejercería contra microbios determinados y en condiciones bien definidas, una acción vital y no una acción química.

Salimbeni <sup>(45)</sup> consideró que el fenómeno descrito por d'Herelle es simplemente determinado por un microorganismo que presenta un pleomorfismo considerable y cuyas esporas pasan a

través de los poros de una bujía Chamberland L<sub>2</sub>. En un estudio de la lisis sobre preparaciones convenientemente fijadas y coloreadas, llegó a la conclusión de que el bacteriófago sería una mixameba próxima a las Tallophitas, del orden de los Myxomycetes, y para el cual propuso el nombre de "Myxomyces shigaphagus".

Maisin (46) estudiando la diálisis del fermento bacteriófago con las membranas dialisantes que se emplean en los ensayos de la reacción de Abderhalden, observó que el fermento no transpone la membrana, con lo que no se comporta como un cristalóide.

Bruynoghe (47) teniendo en cuenta que el principio lítico puede, por adaptación, volverse activo para gérmenes que al principio escapaban a su acción, y que por simbiosis prolongada con un microbio dado puede exaltar su virulencia para este último y volverse inactivo para los demás gérmenes, consideró que esta ausencia de especificidad del bacteriófago aboga por la teoría del virus, considerando al bacteriófago como un ser autónomo.

Bachmann y Aquino (48) encontraron que los fermentos intestinales, sobre todo la pancreatina, tenía el poder de producir la lisis transmisible en serie de B. Shiga-Kruse. También obtuvieron resultados positivos con veneno de *Lachesis alternatus* y bilis estéril.

Pico (49) observó que las soluciones de tripsina o pancreatina comerciales esterilizadas por filtración, producían la lisis. También ensayó con buen resultado la papaiotina y la papaína calentadas a 100°, y fermentos leucocitarios. Más adelante (50) obtuvo autólisis transmisible del *Bacillus anthracis* sin intervención del hipotético virus bacteriófago. Concluyó, así, que el principio lítico está contenido y es elaborado por los microbios mismos y que "la bacteriofagia consiste en una activación

de la autólisis normal de las bacterias, que se manifiesta en ciertas condiciones experimentales".

Combiesco (51) encontró el principio lítico en la enteroquinasa y en la tripsina del comercio.

Bail (52) atribuyó la lisis progresiva al efecto de unos cambios degenerativos en los cromosomas de las bacterias, capaz de transmitirse indefinidamente.

Hauduroy (53) de sus experiencias concluye que el fenómeno de d'Herelle es producido por un complejo : el bacteriófago propiamente dicho, capaz de reproducirse, y sustancias segregadas por los microbios lisables. Sólo la presencia de los dos elementos sería capaz de hacer aparecer la lisis.

Da Costa Cruz (54) demostró que la lisis microbiana transmisible se realiza solamente cuando hay, en el medio, sales disociadas. Por lo tanto, el bacteriófago no es un virus, como supone d'Herelle, ni una secreción bacilar debida a una mutación, como lo expresaron Bordet y Ciuca. Por su parte Da Costa Cruz equiparó la lisis transmisible con la formación de la trombina en el proceso de coagulación de la sangre.

Fejgin y Supniewski (55) expresaron que el resultado de la extracción del agente lítico por el éter en aparato de Soxhlet, la ausencia de la reacción de la catalasa y de la reductasa, la posibilidad de aislar el agente lítico de algunos viejos cultivos en caldo, y el hecho de que el agente lítico no lisa más que las bacterias vivientes, permiten pensar que la lisis bacteriana transmisible es producida por una sustancia elaborada por las bacterias vivientes.

Olsen y Yasaki (56), destilando al vacío, a 45-50°C un cultivo lisado de bacterias, obtuvieron el pasaje de los corpúsculos bacteriófagos en el destilado, concluyendo así que el -

bacteriófago es una sustancia química volátil.

Mc Kinley (57) aisló una "sustancia" lítica para numerosos organismos patógenos, de varios tejidos normales y patológicos de hombres y animales, con las características esenciales del bacteriófago. Habría, pues, "algo" dentro de las células de los tejidos, que actuaría como o sería el origen del principio lítico conocido como el bacteriófago; una "sustancia" capaz de "reproducirse o multiplicarse" en un medio celular tal como las suspensiones bacterianas.

Bronfenbrenner y Korb (58) repitieron la experiencia de Olsen y Yasaki y establecieron que el principio lítico concerniente al fenómeno de lisis transmisible no es volátil.

Hadley (59) desarrolló su "teoría homogámica" de la acción del bacteriófago, suponiendo que el bacteriófago es, ya sea, una definida etapa en el ciclo vital de las especies bacterianas, o una partícula funcionalmente activa, accesoria a una de estas etapas. Según esta teoría, el corpúsculo bacteriófago y la célula que la genera o a la que ataca son dos elementos componentes de un definido mecanismo reproductivo, poseído por muchas, si no por todas las bacterias.

Plantureaux (60) demostró que es posible, cultivando en medio muy alcalino (agregando a una suspensión de cepas puras en caldo, cantidades crecientes de solución N de soda) hacer aparecer en las cepas bacterianas puras un poder lítico transmisible en serie. Esta posibilidad, es incompatible con la hipótesis de que la lisis es determinada por un microorganismo viviente, como supone d'Herelle; por lo tanto el término de bacteriófago es impropio, y Plantureaux propone designarlo "bacteriolito".

Asheshov, Asheshov, Khan y Lahiri (61) establecieron que el hecho de haber tratado exitosamente en la práctica al bac-

teriófago como un cultivo de un ser viviente, demuestra que la naturaleza viviente del bacteriófago no es una hipótesis o una teoría, sino un hecho.

En un reciente trabajo Luria, Delbrück y Anderson (62) observaron mediante el microscopio electrónico el proceso de interacción del bacteriófago y la bacteria correspondiente, hasta la lisis final. Consideraron al bacteriófago como un virus bacteriano.

No se trató aquí de citar todos los trabajos sobre la naturaleza del bacteriófago, pues la bibliografía es extensísima, sino de dar sólo una suscita reseña del tema.

### 3) Métodos de investigación del bacteriófago

D'Herelle (39) para el caso de enfermos de disentería empleó la siguiente técnica para la búsqueda del bacteriófago: introdujo de 2 a 3 gotas de las heces diarreicas en 20 cc de caldo, incubó a 37° durante 18 horas y filtró por bujía Chamberland L<sub>2</sub>. La lisis se demostró con una emulsión de Shiga en caldo. En caso de ser muy débil el poder lítico, tomó 1 cc del filtrado y añadió una gota de un cultivo en caldo, de 24 horas, de bacilos de Shiga, colocando todo, durante 12 a 18 horas a 22° y luego 2 a 3 horas a 37°; si el filtrado al salir de la estufa era turbio, se extendía una gota sobre la superficie de un tubo de agar inclinado que era colocado durante 24 horas a la estufa a 37° y se observaba si aparecían zonas perfectamente circulares donde el agar quedaba desnudo, sin cultivo.

Bachmann (63) estableció que la reacción del medio más adecuada para la acción del bacteriófago es de alrededor de -



pH 8. Utilizó el siguiente método de aislamiento de bacteriófagos : sembró 1 ml del contenido de un pozo ciego en 150 ml de caldo nutritivo, incubó por 24 horas a 37° y filtró primero por papel y luego por bujía Berkefeld. La actividad lítica del filtrado se ensayó en la siguiente forma : dispuso en tres tubos 1 cc de un cultivo en caldo, de 24 horas de edad, de bacilos de Shiga-Krusse y agregó 0,5 cc, 0,3 cc y 0,1 cc del filtrado y 3,5 cc, 3,7 cc y 3,9 cc de caldo nutritivo, respectivamente. A las 24 y 48 horas de incubación observó el resultado. Además, simultáneamente preparó un control de esterilidad del filtrado y otro para el desarrollo normal de la bacteria susceptible.

Arnold (64) para casos de muy pequeña concentración de bacteriófago, recomendó mezclar la muestra con igual cantidad de caldo nutritivo de doble concentración, enriquecer con una suspensión de la bacteria susceptible e incubar 24 horas a 37°C. De esta manera, por sucesivos pasajes o enriquecimientos se consigue exaltar notablemente la capacidad lítica del bacteriófago, que finalmente se hace capaz de lisar cepas previamente resistentes. - Luego de filtración por bujía Berkefeld, el filtrado, agregado de caldo nutritivo, fué inoculado con una suspensión bacteriana para observar la lisis luego de incubar. Además, practicó resiembras - en placas con agar para comprobar la presencia de colonias irregulares o áreas estériles al cabo de 24 horas de incubación a 37°.

Ferretti (65) constató que para observar la lisis, - el caldo simple, en la mayor parte de los casos da buen resultado, pero cuando se trata de investigar un leve poder lítico es preferible reemplazarlo por caldo de doble concentración. No encontró ventaja en el uso del caldo glucosado al 0,50 %, ni del medio sintético de Pozerschi a base de succinato de amonio y fosfato disódico. Además, comprobó que pH : 7,7 es el óptimo para poner de manifiesto la lisis en los ensayos con caldo en tubos, pudiendo va-

riar entre 6,1 y 7,7; mientras que en los ensayos con agar hay inhibición por debajo de pH : 7,7.

Stewart y Ghosal (66) emplearon la siguiente técnica de aislamiento del bacteriófago : 10 cc de barro cloacal crudo o su efluente luego del tratamiento con barro activado fueron puestos en 50 cc de caldo nutritivo (pH : 7,8), incubado por 18 horas a 37° y luego filtrado por papel de filtro con tierra de infuso - rios y finalmente filtrado por bujía Chamberland L<sub>3</sub> en el aparato filtrante de Martín. Los filtrados fueron incubados por la noche para control de esterilidad y luego conservados en la cámara fría hasta ser usados. El método para comparar la acción lítica del - filtrado fué el siguiente : se prepararon cultivos en caldo de 24 horas de los organismos a ser usados; se dispusieron series de 7 tubos con caldo. Un ansa de cada cultivo fué entonces inoculado - en los 7 tubos de cada serie. Un tubo fué apartado como control y los otros 6 tubos fueron inoculados con el filtrado del líquido - cloacal para dar diluciones de 1 en 10, 100, 1.000, 10.000, - 100.000 y 1.000.000. Los tubos fueron incubados a 37°C y examina - dos en su acción lítica luego de 6 horas. Además, un ansa de cada tubo fué sembrado sobre agar inclinado para estudiar la formación de placas.

Asheshov, Asheshov, Khan y Lahiri (61) aislaron bac - teriófago de la siguiente manera : a un agua de peptona al 20 % - se añade el agua o líquido cloacal filtrados, en cantidad tal que quede una solución al 1 % de agua de peptona. Luego se hace un en - riquecimiento añadiendo un cultivo fresco (1 o 2 cc por cada 100 cc de líquido) de la bacteria sensible al bacteriófago que se en - sayas; se deja hasta el día siguiente y se filtra. Con el filtrado se hacen diluciones en caldo. Recomendaron el uso de caldo con - 0,5 % de "materia oxidable" y 0,5 % de cloruro de sodio y de pH : 8,0. Si es necesario, la reacción se corrige durante la incuba -

ción por adición de una solución estéril al 4 % de hidróxido de sodio, usando como indicador rojo fenol. Indicaron además el siguiente método rápido para determinar la presencia de bacteriófagos : sobre la superficie de agar se extiende una emulsión de la bacteria correspondiente, de modo de obtener una capa continua. Una vez seca la superficie, se coloca una gota del filtrado. En caso de haber bacteriófago, al día siguiente se observará un área clara. El agar para las cajas de Petri debe ser al 1,1 %, en caldo con 0,75 % de "materia oxidable", y de pH : 7,4.

Rakieten, Eggerth y Rakieten (67) emplearon el siguiente método de aislamiento de bacteriófagos de líquidos cloacales. A 900 ml de líquido cloacal ligeramente alcalinizado con hidróxido de sodio, agregaron 100 ml de caldo Savita diez veces concentrado, de pH : 7,5. La mezcla la dividieron en porciones de 200 ml, a cada una de las cuales agregaron 1 ml de un cultivo de 18 horas de la bacteria susceptible al bacteriófago que se investigó. Después de incubar 18 a 22 horas a 35°, filtraron a través de bujía Chamberland L<sub>5</sub>.

Moize (68) desarrolló el siguiente método para la investigación de bacteriófago en aguas contaminadas y líquidos cloacales : la muestra adicionada de caldo nutritivo diez veces concentrado fué enriquecida con un cultivo joven de la bacteria susceptible y luego incubada 24 horas a 37°, después de lo cual filtró por bujía Berkefeld W. El ensayo de la actividad bacteriofágica del filtrado lo efectuó poniéndolos en presencia de la correspondiente bacteria y observando la permanencia de la limpidez del caldo nutritivo y áreas traslucidas en agar.

---

4) Significado de la presencia del bacteriófago y su posible intervención en la purificación del agua y líquidos cloacales

Siendo el tract intestinal un habitat normal del bacteriófago, éste ha de ser encontrado por consecuencia en heces y en el líquido cloacal. Este hecho ha dado lugar a muchas investigaciones sobre el posible papel del bacteriófago en la autopurificación de los líquidos cloacales y de las aguas contaminadas.

Flu (69) comprobó que la autopurificación del agua es efectuada aún en ausencia del bacteriófago, desde que su presencia no acelera el proceso ni lo vuelve más completo. Sus experiencias dejaron la evidencia concluyente del prominente papel jugado por los protozoarios en la autopurificación del agua. Eliminando los protozoarios, comprobó que la autopurificación del agua es completamente detenida aún habiendo añadido bacteriófago al agua.

Arnold (64) estableció que la presencia del bacteriófago en el agua superficial es demasiado variable como para ser usado como criterio de la contaminación con líquido cloacal doméstico, y su determinación no puede compararse con los reconocidos métodos bacteriológicos y químicos empleados para establecer la existencia de contaminación. Sin embargo, Arnold consideró que la impregnación de agua filtrada con bacteriófago activo contra ciertas bacterias patógenas gastro-intestinales, ofrece un nuevo campo de investigación en los problemas de la purificación del agua, y de igual importancia sería la utilización de estas autolisinas transmisibles de bacterias en los problemas de la disposición del líquido cloacal.

Arloing y Sempé (70) estudiaron el poder antimicro -

biano lítico de las aguas de algunos puertos de la América del Sud (Dársena N de Buenos Aires, muelle del frigorífico Swift de la Plata, etc.) encontrando lisis muy débil para el bacteriófago paratífico A, B. de Eberth, B. de Shiga y nulo para el B. coli, y refirieron dicha acción lítica a un principio bacteriófago presente en el filtrado de las aguas dotadas de poder lítico sobre la flora bacteriana intestinal. A este hecho atribuyeron, Arloing y Sempé, la esterilización natural de las napas de agua, así como la inmunidad de que gozan ciertas regiones o ciertos individuos respecto de infecciones de origen hídrico.

Monteiro (71) atribuyó a los bacteriófagos un papel de significación en la depuración biológica de la naturaleza y en la defensa sanitaria natural de la humanidad contra un cierto número de agentes patógenos.

Fabry (72) concluyó que, si bien la presencia de colibacilo en un agua la hace considerar como sospechosa, la ausencia, en cambio, de colibacilo o de cualquier otro microbio intestinal no prueba de una manera absoluta que esta agua no esté polucionada, ya que el colibacilo pudo haber sido lisado por el bacteriófago y así no ser encontrado por la técnica habitual. La búsqueda de bacteriófago en un agua podría, quizá, hacer sospechar la polución de la misma, ya que el bacteriófago proviene del medio intestinal.

Renau (73) estableció que la presencia de principios líticos debería ser interpretada como un signo favorable de autodepuración de las aguas alimenticias y residuales, y que se puede afirmar con toda certitud que la presencia de bacteriófago en un agua de consumo no significa que la misma esté contaminada con materias fecales. Cuando hay polución se encuentran principios líticos muy activos, pero la recíproca no es verdad. Por consiguiente no habría ninguna ventaja en completar con la búsqueda

de bacteriófago los análisis químicos y bacteriológicos actualmente en uso.

Beckwith y Rose (74) en un estudio tendiente a investigar la causa de la autopurificación del líquido cloacal, establecieron que, si bien las condiciones en el líquido cloacal no son óptimas para la multiplicación y adaptación del bacteriófago, parece que las cepas de fagos presentes no solamente inhiben el crecimiento bacteriano sino que ocasionan, en algún grado, una disminución de la flora bacteriana intestinal allí presente.

Stewart y Ghosal (66) hicieron una investigación con el objeto de determinar si la acción lítica de los fagos del líquido cloacal juega algún papel en la acción germicida que se observa en el proceso del barro activado. Para ello compararon la acción lítica, sobre el grupo coli de organismos y sobre B. Shiga y Flexner, de los filtrados del líquido cloacal crudo y los filtrados de sus efluentes luego del tratamiento. De estas experiencias dedujeron que la acción germicida en el proceso del barro activado no es debida a una actividad del bacteriófago del líquido cloacal. Observaron una definida acción destructiva sobre el bacteriófago del líquido cloacal, que recién se manifiesta a las 6 horas de aereación, con una reducción del 90 % de los fagos. Luego de 24 horas de aereación encontraron cerca del 100 % de reducción, siendo algunas cepas de fagos completamente destruídas. En un trabajo anterior, estos investigadores encontraron que, en el proceso de los barros activados, el coli tanto como los organismos patógenos disminuyen a una velocidad marcada desde la primer hora de aereación, con lo que el fago parecería ser más resistente que las bacterias. (75)

Khan (76) investigando la causa del poder vibriocida del Río Ganges, encontró que no era debido al bacteriófago, ya -

que era vibriocida aún cuando no se encontró cholera-fago.

Stewart y Ghosal (77) estudiando el comportamiento del bacteriófago presente en el agua cruda, durante el proceso de la filtración por arena, llegaron a la conclusión de que el bacteriófago no juega ningún papel en la purificación del agua en los filtros de arena, y que esta filtración tiene una marcada acción destructiva sobre el fago presente en el agua cruda.

Segre (78) reveló la constante presencia del bacteriófago en el río Pó y tres de sus efluentes, en tal intensidad de modo de no hacer dudar acerca de su intervención como elemento eficaz en la auto depuración del agua.

Violle (79) en experiencias sobre los barros activados, observó que los principios líticos anti-shiga, muy pronunciados en las aguas de albañales brutas, persistían todavía después de un tratamiento con barros activados y una intensa aereación. Recién cuando el número de gérmenes microbianos, primitivamente muy elevado, disminuía considerablemente hasta alcanzar un 90 % de reducción y luego de mantener por mucho tiempo estas aguas en contacto con los barros activados, se llegaba finalmente a suprimir este principio lítico.

Gildemeister y Watanabe (80) usando muestras de agua del río Spree y de un lago del Sudoeste de Berlín, comprobaron que en ningún caso se encontró acción bacteriofágica sin incubación previa a 37° de una mezcla de las muestras de agua con partes iguales de caldo nutritivo, indicando ésto que el bacteriófago no es importante en la autopurificación del agua de río. Observaron además un aumento en el contenido de bacteriófagos luego de la lluvia y del deshielo, por lo que establecieron que la determinación de bacteriófago es conveniente para la investigación de contaminación, si no ha habido lluvia o deshielo durante 5 días antes d

la recolección de la muestra.

Vagedes (81) investigando colifago en muestras de agua de consumo, señaló que la presencia del colifago puede ser tomada como índice para indicar algún error en la planta y dar idea de la eficiencia de la filtración. Encontró que las aguas superficiales no polucionadas estaban principalmente libres de lisina y B. coli, con lo que en tales casos el ensayo del bacteriófago es un útil agregado al examen bacteriológico, pero comprobó además que en algunas muestras de aguas residuales y líquidos cloacales no se encuentra lisina a pesar de estar fecalmente polucionadas, con lo que el ensayo no es satisfactorio en esos casos

Beard (82) destacó la marcada acción adsorbente que ejercen sobre los bacteriófagos el material suspendido de las aguas polucionadas, restándole así efectividad en su acción lítica. Esta circunstancia, y el hecho de que no se cumplan las condiciones óptimas para la lisis, indujeron a Beard a manifestar que no parecería posible que el bacteriófago participase significativamente en la reducción del número de bacteria del agua polucionada o del líquido cloacal, ni tampoco parecería probable que su presencia causase interferencia u origine una errónea interpretación en las pruebas de rutina empleadas para la examinación sanitaria del agua y líquidos cloacales.

Goldie (83) atribuyó sobre todo a la lisis y a la destructiva acción de los organismos saprófitos, la gran reducción del número de organismos patógenos en el líquido cloacal. Consideró el proceso del barro activado, aplicado a la purificación de líquidos cloacales, como un efectivo método de destrucción de patógenos por bacteriolisis.

Sievers (84) estudiando la susceptibilidad de ciertas bacterias del líquido cloacal a la acción de los bacteriófagos



obtenidos de filtrados de aguas, llegó a la conclusión de que los bacteriófagos juegan un importante papel en el tratamiento del barr<sub>o</sub> cloacal. Encontró que el número de cepas de bacterias lisinasensitivas disminuye durante el tratamiento del líquido cloacal, si bien no desaparecen completamente. Agregó que, si bien no hay prueba de que esta reducción sea debida a la acción de los bacteriófagos, ciertos hechos indican la probabilidad de esta teoría, especialmente respecto del proceso del barro activado.

Couture (85) considerando que bastante frecuentemente se encuentran bacteriófagos en el agua en ausencia de todo otro microbio, y que las aguas privadas de principios líticos ofrecen al análisis colibacilos, concluyó que es indiscutible que la sola búsqueda de colifagos no permite por sí solo determinar el valor sanitario de un agua desde el punto de vista bacteriológico.

Sangiorgi (86) estudiando la actividad de los principios líticos en líquidos contaminados tratados con barros activados, constató que en la mayor parte de los casos se observa una disminución en la actividad de los fagos del líquido tratado (efluente) respecto del líquido bruto (afluente) y puede resultar una anulación completa de la actividad, si los fagos del afluente son originariamente débiles.

Rhodes y Ludlam (87) encontraron fagos en aguas sin contaminación fecal humana, y atribuyeron la presencia de los mismos a contaminación con los excrementos de animales que pastoreaban cerca de las represas. De sus experiencias concluyeron que el hallazgo en aguas de suministros de un fago para bacilos disentéricos, no es por sí solo suficiente prueba de que el agua está contaminada por éstos organismos patógenos.

En su tesis doctoral, Moizo (68) investigó la presencia de bacteriófagos en aguas contaminadas y líquidos cloacales de Buenos Aires, constatando una gran actividad lítica, sobre todo, para varias especies del género *Shigella*. Comprobó además que no es simultánea la presencia de bacterias y sus bacteriófagos respectivos.

5) Supervivencia de las bacterias en el líquido y en el barro cloacal

Kligler (88) encontró que las bacterias causantes de la fiebre tifoidea y disentería, sucumben rápidamente en la naturaleza. Ambos organismos mueren al término de uno a cinco días en los tanques sépticos.

Wolman (89) en un estudio sobre la posible diseminación de enfermedades de origen vegetal, causadas por el barro cloacal usado como fertilizante del suelo, estableció que si el barro cloacal es conservado en un tanque de digestión por un período de no menos de 10 días, su aplicación al suelo puede ser practicada sin detrimento de la salud pública.

Heukelekian (34) en un estudio sobre el posible destino del *B. coli* y *B. aerógenes* en la digestión de sólidos cloacales frescos, barro maduro y mezclas de ambos, encontró que el número de estos organismos aumentó en los sólidos frescos en los primeros dos días de incubación, para volver a su número original dentro de la semana y alcanzar un nivel muy bajo luego de dos semanas.

Stewart y Ghosal (75) observaron que el contenido bacteriano del líquido cloacal se reduce muy considerablemente durante el proceso del barro activado. Una cierta cantidad de emul-

sión de bacterias fué agregado al líquido cloacal y aereado con 15 % de barro activado. Cada hora se hizo sedimentar diez minutos y se examinó 1 cc del líquido sobrenadante. En esta forma constataron que la proporción de *B. coli* comunis e intermedio disminuyó y que aumentó el *B. cloacae*. El proceso ejerció acción bactericida sobre el *B. typhosus*, *B. paratyphosus* A y *V. cholerae*. La acción germicida fué progresivamente activa desde la primer hora. Después de seis horas de aereación con 15 % de barro activado, se observó la máxima acción.

Gray (90) encontró *Bact. paratyphosum* B en 7 de 20 muestras de líquido cloacal de la ciudad de Edinburgh. Hizo experiencias para determinar el período de supervivencia del *B. paratyphosum* B en el líquido cloacal, examinando todas las muestras de las principales plantas de tratamiento, uno, dos y cuatro días después de su extracción de la planta. En ningún caso fué aislado el *B. paratyphosum* B, de manera que este hecho indica un corto período de supervivencia de dicho organismo en el líquido cloacal.

Wilson y Blair (91) señalaron que es posible para el *B. typhosus* y *paratyphosus* sobrevivir en el líquido cloacal, bajo condiciones naturales, durante 5 semanas (38 días), cuando se lo conserva en botellas a la temperatura del cuarto y expuesto a la luz. Además, los organismos parecen desaparecer con el tiempo del líquido sobrenadante y sobrevivir en el sedimento.

Heukelekian (92) practicó un recuento de *Es. coli* y *Aerobacter* aerógenos en muestras de líquido cloacal tamizado, diluido con solución buffer de fosfato, e incubado a 20°C. Observó un aumento inicial en el número de *E. coli* en las primeras 24 horas de incubación, disminuyendo luego rápidamente el número de ambos grupos de organismos, hasta alcanzar un nivel bajo a los 3 e 4 días.

Ruchhoft (93) estudió la supervivencia del *B. typhosus* durante la digestión del barro activado, artificialmente infectado, a 20-22,2°C. Hizo el ensayo con cuatro cepas de *B. typhosus* : dos cepas fueron aisladas del barro luego de 13 y 14 días respectivamente; otra cepa murió muy rápidamente y la cuarta sobrevivió 11 días. A 10-15,5°C el *B. typhosus* fué aislado del barro luego de 83 días.

Neri (94) encontró que el contenido de *E. coli* del barro cloacal es marcadamente reducido durante el proceso de digestión. En el barro digerido, el *E. coli* fué reducido por lo menos en un 96 % respecto del barro fresco. Este comportamiento del *E. coli* indujo a Neri a establecer que no hay posibilidad de que las bacterias patógenas se multipliquen durante la digestión del barro y que "la cámara de digestión del barro es la tumba de los microorganismos patógenos".

Heukelekian y Schulhoff (95) en una investigación sobre la supervivencia del *B. typhosus* en aguas polucionadas y en líquidos cloacales, encontraron una rápida disminución del número de *B. typhosus*. Durante la digestión anaeróbica de sólidos cloacales, el *B. typhosus* decrece lentamente durante los primeros dos días y luego a mayor velocidad. El *B. coli*, por otra parte, aumenta en número durante los primeros dos días y luego decrece rápidamente, de modo que a los pocos días se tiene una reducción del 99 %. La velocidad de disminución es afectada por la temperatura, siendo mayor a 22° y 37°C que a 2°C.

## II) PORTE EXPERIMENTAL

### 1) Métodos empleados para el aislamiento e investigación del bacteriófago.

Con el objeto de observar la variación de la actividad bacteriofágica durante la digestión del barro cloacal que se obtiene por sedimentación directa del efluente cloacal, muestras de barro procedentes de la Estación de Bombas de Wilde fueron incubadas a 37° y 55°C y durante la digestión se extrajeron periódicamente muestras de una y otra porción para investigar la actividad lítica. (\*)

Las pruebas de lisis se hicieron con bacteriófagos para las siguientes cepas : S. paratyphi A 1015; S. paratyphi B 8006 y Sh. dysenteriae (Shiga 6) de la colección de O.S.N. y con E. coli (tipo I) aislado de una muestra de agua.

En todos los casos, las muestras de barro antes de ser incubadas fueron previamente molidas haciéndolas pasar por un molinillo, de modo de obtener un material homogéneo con partículas sólidas de tamaño adecuado para las subsiguientes tomas de muestra mediante una pipeta. (Esta técnica de la molienda de sólidos cloacales fué adoptada como práctica standard de laboratorio por Gordon M. Fair y Edward W. Moore : (Sewage Works Jour. : 7, 417, 1935), luego de haber comprobado una mejor digestión con sólidos molidos.

Además, con el objeto de estudiar la marcha de la digestión, a cada muestra de barro fresco se le hicieron determinaciones de humedad, sólidos totales, sólidos volátiles y cenizas,

---

(\*) En Wilde termina la primera sección de la cloaca máxima, y allí la Estación de Bombas lo impulsa a la segunda sección que termina en Berazategui.

determinaciones que se repitieron cada mes durante el curso de la experiencia.

Por otra parte, junto con las muestras para la investigación de bacteriófago, se extrajo otra porción de barro para la determinación del pH.

La técnica adoptada para el aislamiento de bacteriófago fué seleccionada, mediante ensayos previos, de entre los métodos anteriormente descritos, y fué la siguiente : en cuatro frascos Erlenmeyer de 120 cc de capacidad se colocaron 40 cc de barro, y luego de llevar el pH, con hidróxido de sodio, a un valor próximo a 7,5, se agregó 10 cc de caldo nutritivo cinco veces concentrado, de pH 7,5, y 0,5 cc de un cultivo en agua de peptona, de 18 a 24 horas, de la cepa bacteriana susceptible al bacteriófago que se investigó. Se incubó a 37°C durante 18 a 24 horas, y se filtró a través de papel de filtro de poro fino colocado en un embudo Buchner adaptado a un frasco Kitasato por el que se hizo vacío. De esta forma se logró separar la mayor parte de las partículas sólidas en suspensión. Finalmente se filtró a través de una bujía Berkefeld W, recogiendo en un tubo de ensayo estéril unos 15 a 20 cc. El filtrado se incubó a 37°C hasta el día siguiente para ensayar su esterilidad, y luego se conservó en la cámara fría (2 a 4°C) hasta ser usado.

Para el ensayo de la actividad lítica del filtrado se hicieron dos pruebas : una en medio líquido (caldo nutritivo) y otra en medio sólido (agar al 1 % en caldo nutritivo).

La técnica seguida para comprobar el poder lítico en caldo nutritivo fué el de las diluciones en serie del filtrado y subsiguiente siembra con un cultivo joven de bacterias, que se efectuó, según la técnica descrita por Zinsser y Bayne-Jones : Se preparó para cada una de las cuatro especies bacterianas una se -

rie de 12 tubos de ensayos esterilizados conteniendo 9 cc de caldo nutritivo de pH 7,5. El tubo 11° se reservó para control de esterilidad del filtrado, y el tubo 12° se usó para control de desarrollo normal de la cepa bacteriana ensayada. Al primer tubo se le agregó 1 cc del filtrado y una vez bien mezclado se pasó 1 cc de este tubo al segundo, y así sucesivamente hasta el 10° tubo. Se obtuvieron así diluciones del filtrado, desde 1:10 hasta 1: 10.000.000.000. Al tubo 11° se le agregó un cc del filtrado correspondiente. Luego se añadió en cada uno de los diez primeros tubos, 0,1 cc de un cultivo en agua de peptona (de 18 a 24 horas de la cepa bacteriana susceptible al bacteriófago que se ensaya, también al tubo 12° (control de desarrollo de la cepa bacteriana). Se dejó hasta el día siguiente en estufa a 37° y entonces se observó el resultado, que se anotó en la siguiente forma :

- El filtrado no mostró ninguna acción lítica. Normal desarrollo de las bacterias.
- + Débil acción lítica. Desarrollo algo inferior al normal.
- 2 + Moderada acción lítica. Desarrollo moderado.
- 3 + Fuerte acción lítica. Desarrollo leve.
- 4 + Lisis completa. El caldo queda completamente limpio.

La técnica seguida para la lisis en agar fué la propuesta por Asheshov y colaboradores <sup>(56)</sup> : sobre un cuarto de caja de Petri con agar al 1 % en caldo nutritivo (pH 7,5) se extendió con el ansa 1 gota de un cultivo en agua de peptona (con 18 a 24 horas de incubación) de la bacteria contra la cual se ensayó el poder lítico del filtrado, en forma de obtener una capa uniforme y que cubra un cuarto de caja de Petri, y se dejó media hora

37° para que se seque la superficie; luego con el ansa, se coló en el medio de la capa I gota del filtrado original. Se dejó hasta el día siguiente a 37° y se expresó el resultado en forma análoga a la descripta anteriormente :

- No hubo lisis. Normal desarrollo de las bacterias.
- + Débil acción lítica. Desarrollo casi normal.
- 2 + Moderada acción lítica. Se observa un área levemente translúcida.
- 3 + Fuerte acción lítica. Se observa un área clara.
- 4 + Lisis total. Se observa un área completamente clara.

Para las determinaciones de humedad, sólidos total sólidos volátiles y cenizas, en el barro, se siguieron las técnicas descritas en los "Standard Methods for the Examination of Water and Sewage".

El pH del barro se determinó potenciométricamente, con electrodo de vidrio.

## 2) Variación de la actividad bacteriofágica durante el proceso de digestión del barro cloacal

### ENSAYO Nº 1

La primera muestra de barro cloacal (unos 20 lt) procedente de Wilde se recibió el 12 de Mayo de 1943. Fué conservada hasta el día siguiente en la cámara fría y luego molida hasta contener unos 17 litros que se repartieron a razón de 8 litros en cada uno de dos frascos esterilizados de 10 litros de capacidad. Reservó un litro de barro para determinar el poder lítico del b



rro fresco inicial y para las determinaciones químicas ya citadas.

A los efectos de cumplir la condición de anaerobiosis necesaria para que tenga lugar la digestión del barro cloacal, cada frasco se proveyó de un tapón de goma atravesado por un tubo de vidrio prolongado en un tubo en U que se llenó hasta las 3/4 partes de su altura con agua, en forma de permitir la salida de los gases que se producen durante la digestión.

Una porción se incubó a 37° y la otra a 55°.

Se extrajeron muestras cada 10 días.

Los resultados fueron los siguientes :

Barro fresco : Muestra I											
Cepa	Ensayo en agar	Ensayo en caldo nutritivo									
		Dilución									
		10	2	3	4	5	6	7	8	9	10
S. paratyphi A	4 +	4 +	4 +	4 +	4 +	3 +	3 +	3 +	2 +	2 +	2 +
S. paratyphi B	4 +	4 +	4 +	4 +	4 +	4 +	3 +	3 +	3 +	3 +	2 +
Sh.dysenteriae	4 +	4 +	4 +	4 +	4 +	4 +	4 +	4 +	4 +	3 +	3 +
E. coli	3 +	2 +	2 +	2 +	2 +	+	+	+	+	+	+

Digestión a 37°C de la muestra I

Tiempo de digestión : 10 días											
Cepa	Ensayo en agar	Ensayo en caldo nutritivo Dilución									
		10	2 10	3 10	4 10	5 10	6 10	7 10	8 10	9 10	10 10
S. paratyphi A	4 +	4 +	3 +	3 +	3 +	3 +	2 +	2 +	2 +	+	+
S. paratyphi B	4 +	4 +	4 +	3 +	3 +	3 +	2 +	2 +	+	+	+
Sh.dysenteriae	4 +	4 +	4 +	4 +	4 +	3 +	3 +	3 +	3 +	2 +	2 +
E. coli	2 +	2 +	2 +	2 +	+	+	+	+	+	+	+
Tiempo de digestión : 21 días											
S. paratyphi A	3 +	4 +	3 +	3 +	3 +	2 +	2 +	+	+	+	-
S. paratyphi B	3 +	3 +	2 +	2 +	2 +	2 +	+	+	-	-	-
Sh.dysenteriae	4 +	4 +	4 +	4 +	3 +	3 +	2 +	2 +	+	+	+
E. coli	2 +	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Tiempo de digestión : 30 días											
S. paratyphi A	3 +	2 +	2 +	2 +	2 +	2 +	+	+	-	-	-
S. paratyphi B	2 +	2 +	2 +	+	+	+	-	-	-	-	-
Sh.dysenteriae	3 +	3 +	3 +	3 +	3 +	2 +	2 +	+	+	+	-
E. coli	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-

Digestión a 37°C de la muestra I

Tiempo de digestión : 40 días											
Cepa	Ensayo en agar	Ensayo en caldo nutritivo Dilución									
		10	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>9</sup>	10 <sup>10</sup>
S. paratyphi A	2 +	2 +	+	+	+	-	-	-	-	-	-
S. paratyphi B	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sh.dysenteriae	2 +	2 +	2 +	+	+	+	+	-	-	-	-
E. coli	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Repetidos los ensayos a los 50 y 60 días, se obtuvieron, con todos los filtrados, resultados negativos.

Digestión a 55°C de la muestra I

Tiempo de digestión : 10 días											
Cepa	Ensayo en agar	Ensayo en caldo nutritivo Dilución									
		10	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>9</sup>	10 <sup>10</sup>
S. paratyphi A	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
S. paratyphi B	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sh.dysenteriae	2 +	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
E. coli	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

A los 21 y 30 días, todos los filtrados dieron resultados negativos.

Como se observa, en este primer ensayo se comprobó - una gradual disminución en el poder lítico del barro durante la digestión a 37° y una disminución rápida a 55°, de manera que se anuló completamente toda actividad bacteriofágica al cabo de 50 días en la digestión a 37° y a los 20 días en la digestión a 55°.

Determinaciones químicas

	Barro fresco (Muestra I)	Barro digerido 1 mes		Barro digerido 2 meses 37°	Barro digerido 3 meses 37°
		37°	55°		
<u>Humedad</u>	94,99 %	95,52 %	96,35 %	96,28 %	96,85 %
<u>Sólidos totales</u>	5,01	4,48	3,65	3,72	3,15
<u>Sólidos volátiles *</u>	69,46	64,29	53,61	54,30	48,25
<u>Cenizas *</u>	30,54	35,71	46,39	45,70	51,75

\* Referido a los sólidos secos.

Este aumento de humedad y disminución de sólidos - totales, se debe a que antes de tomar la muestra se agitó cada vez el frasco, de modo de homogeneizar su contenido y llevar una muestra promedio del líquido separado del barro (como consecuencia de la digestión) y del barro propiamente dicho. Esta práctica se siguió a los efectos de verificar la variación de la actividad lítica en el total del barro fresco original.

Variación del valor del pH durante la digestión  
(pH del barro fresco : 5,9)

Tiempo de digestión	10 días	21 días	30 días	40 días	50 días	60 días
pH del barro en digestión a 37°	5,2	6,3	7,0	7,4	7,6	7,7
pH del barro en digestión a 55°	6,9	7,3	7,9	-	-	-

ENSAYO Nº 2

Para este segundo ensayo se recibió muestra de barro cloacal el 19 de Julio. Una vez molido se conservó en cámara fría, y el 21 de Julio se incubaron a 37° dos frascos esterilizados, de cuatro litros de capacidad, conteniendo uno de ellos 3 litros del barro fresco (barro sin sembrar) y el otro aproximadamente igual volumen de una mezcla de dos partes en peso de dicho barro fresco y una parte de barro maduro (con dos meses de digestión) basado en la materia volátil (barro sembrado).

En este ensayo se extrajeron muestras para la determinación de la actividad lítica cada cinco días.

Los resultados fueron los siguientes :

Barro fresco : Muestra II											
Cepa	Ensayo en agar	Ensayo en caldo nutritivo Dilución									
		10	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>9</sup>	10 <sup>10</sup>
S. paratyphi A	4 +	4 +	4 +	4 +	4 +	4 +	3 +	3 +	3 +	3 +	3 +
S. paratyphi B	4 +	4 +	4 +	4 +	3 +	3 +	2 +	2 +	2 +	2 +	2 +
Sh.dysenteriae	4 +	4 +	4 +	4 +	4 +	4 +	4 +	4 +	4 +	4 +	4 +
E. coli	3 +	3 +	3 +	3 +	3 +	2 +	2 +	2 +	2 +	+	+

Digestión a 37° de la muestra II

Tiempo de digestión : 5 días											
Cepa	Ensayo en agar	Ensayo en caldo nutritivo Dilución									
		10	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>9</sup>	10 <sup>10</sup>
S. paratyphi A	4 +	4 +	4 +	3 +	3 +	3 +	3 +	3 +	2 +	2 +	2 +
S. paratyphi B	4 +	4 +	3 +	3 +	3 +	3 +	2 +	2 +	2 +	+	+
Sh.dysenteriae	4 +	4 +	4 +	4 +	4 +	4 +	4 +	3 +	3 +	3 +	3 +
E. coli	3 +	3 +	3 +	2 +	2 +	2 +	2 +	+	+	+	+



Tiempo de digestión : 26 días											
Cepa	Ensayo en agar	Ensayo en caldo nutritivo Dilución									
		10	2 10	3 10	4 10	5 10	6 10	7 10	8 10	9 10	10 10
S. paratyphi A	3 +	3 +	3 +	2 +	2 +	2 +	2 +	2 +	+	+	+
S. paratyphi B	2 +	2 +	2 +	2 +	+	+	+	+	+	-	-
Sh.dysenteriae	4 +	4 +	4 +	3 +	3 +	3 +	3 +	2 +	2 +	2 +	2 +
E. coli	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Tiempo de digestión : 30 días											
S. paratyphi A	2 +	2 +	2 +	2 +	+	+	+	+	+	+	-
S. paratyphi B	2 +	2 +	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Sh.dysenteriae	4 +	4 +	3 +	3 +	3 +	2 +	2 +	2 +	2 +	+	+
E. coli	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Tiempo de digestión : 35 días											
S. paratyphi A	2 +	2 +	+	+	+	+	+	-	-	-	-
S. paratyphi B	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Sh.dysenteriae	3 +	3 +	2 +	2 +	2 +	+	+	+	+	+	-
E. coli	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tiempo de digestión : 41 días											
S. paratyphi A	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
S. paratyphi B	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sh.dysenteriae	2 +	2 +	+	+	+	+	-	-	-	-	-
E. coli	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

A los 45 días ningún filtrado acusó poder lítico.



Digestión a 37° del barro sembrado I

Barro sembrado I sin digerir (2 p. barro fresco + 1 p. barro maduro, basado en la mat. vol.)											
Cepa	Ensayo en agar	Ensayo en caldo nutritivo Dilución									
		10	2 10	3 10	4 10	5 10	6 10	7 10	8 10	9 10	10 10
S. paratyphi A	4 +	4 +	4 +	4 +	4 +	3 +	3 +	3 +	3 +	2 +	2 +
S. paratyphi B	4 +	4 +	3 +	3 +	3 +	3 +	2 +	2 +	2 +	+	+
Sh.dysenteriae	4 +	4 +	4 +	4 +	4 +	4 +	4 +	4 +	3 +	3 +	3 +
E. coli	3 +	3 +	3 +	3 +	2 +	2 +	+	+	+	+	+
Tiempo de digestión : 5 días											
S. paratyphi A	4 +	4 +	4 +	4 +	3 +	3 +	3 +	3 +	3 +	3 +	2 +
S. paratyphi B	4 +	3 +	3 +	3 +	3 +	3 +	2 +	2 +	+	+	+
Sh.dysenteriae	4 +	4 +	4 +	4 +	4 +	4 +	4 +	4 +	3 +	3 +	3 +
E. coli	3 +	3 +	3 +	2 +	2 +	+	+	+	+	+	+
Tiempo de digestión : 10 días											
S. paratyphi A	4 +	4 +	4 +	3 +	3 +	3 +	3 +	3 +	2 +	2 +	2 +
S. paratyphi B	4 +	4 +	3 +	3 +	2 +	2 +	2 +	+	+	+	+
Sh.dysenteriae	4 +	4 +	4 +	4 +	4 +	4 +	4 +	3 +	3 +	3 +	2 +
E. coli	3 +	3 +	2 +	2 +	2 +	+	+	+	+	+	+

Tiempo de digestión : 15 días											
Cepa	Ensayo en agar	Ensayo en caldo nutritivo Dilución									
		10	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>9</sup>	10 <sup>10</sup>
S. paratyphi A	4 +	4 +	3 +	3 +	3 +	3 +	2 +	2 +	2 +	2 +	2 +
S. paratyphi B	3 +	3 +	3 +	3 +	2 +	+	+	+	+	+	+
Sh.dysenteriae	4 +	4 +	4 +	4 +	4 +	4 +	3 +	3 +	3 +	2 +	2 +
E. coli	3 +	2 +	2 +	2 +	+	+	+	+	+	+	+
Tiempo de digestión : 20 días											
S. paratyphi A	3 +	3 +	3 +	3 +	2 +	2 +	2 +	2 +	2 +	2 +	+
S. paratyphi B	2 +	2 +	2 +	2 +	2 +	+	+	+	+	+	+
Sh.dysenteriae	4 +	4 +	4 +	4 +	4 +	3 +	3 +	3 +	3 +	2 +	2 +
E. coli	2 +	2 +	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tiempo de digestión : 26 días											
S. paratyphi A	3 +	3 +	3 +	2 +	2 +	2 +	2 +	2 +	2 +	2 +	+
S. paratyphi B	2 +	2 +	2 +	2 +	+	+	+	+	+	+	+
Sh.dysenteriae	4 +	4 +	4 +	4 +	3 +	3 +	3 +	3 +	3 +	2 +	2 +
E. coli	2 +	2 +	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Tiempo de digestión : 30 días											
S. paratyphi A	2 +	2 +	2 +	2 +	2 +	+	+	+	+	+	+
S. paratyphi B	2 +	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Sh.dysenteriae	4 +	4 +	3 +	3 +	3 +	2 +	2 +	2 +	2 +	+	+
E. coli	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

Tiempo de digestión : 35 días											
Cepa	Ensayo en agar	Ensayo en caldo nutritivo Dilución									
		10 <sup>10</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>9</sup>	10 <sup>10</sup>
S. paratyphi A	2 +	2 +	2 +	2 +	+	+	+	+	+	-	-
S. paratyphi B	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Sh.dysenteriae	3 +	2 +	2 +	2 +	2 +	2 +	+	+	+	+	+
E. coli	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Tiempo de digestión : 41 días											
S. paratyphi A	2 +	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
S. paratyphi B	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Sh.dysenteriae	2 +	2 +	2 +	2 +	+	+	+	+	+	-	-
E. coli	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tiempo de digestión : 45 días											
S. paratyphi A	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
S. paratyphi B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sh.dysenteriae	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
E. coli	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

A los 50 días todos los filtrados dieron resultados negativos.

Se observó una lenta disminución de la actividad bacteriofágica durante la digestión, tanto en barro sin sembrar como en ba

rro sembrado. Se comprobó una reducción en la actividad lítica li-  
geramente más lenta en el barro sembrado.

En la digestión del barro, sin sembrar, al cabo de -  
45 días ya no se observó ningún poder lítico, en cambio, en el ba-  
rro sembrado anulóse toda actividad lítica a los 50 días de diges-  
tión.

Determinaciones químicas

	Barro fresco (Muestra II)	Barro digerido 1 mes	Barro digerido 50 días
<u>Humedad</u>	93,21 %	94,19 %	95,04 %
<u>Sólidos totales</u>	6,79	5,81	4,96
<u>Sólidos volátiles</u>	66,27	60,15	52,38
<u>Cenizas</u>	33,73	39,85	47,62

	Barro sembrado I *	Barro digerido 1 mes	Barro digerido 50 días
<u>Humedad</u>	94,83 %	96,47 %	97,02 %
<u>Sólidos totales</u>	5,17	3,53	2,98
<u>Sólidos volátiles</u>	61,70	48,44	41,16
<u>Cenizas</u>	38,30	51,56	58,84

\* Mezcla de dos partes en peso de barro fresco (muestra II) y una  
parte de barro maduro (muestra I digerida dos meses) basado en la  
materia volátil.

Variación del valor del pH durante la digestión

(pH inicial del barro no sembrado: 6,0)

(" " " barro sembrado: 6,8)

Tiempo de digestión	5 días	10 días	15 días	20 días	26 días	30 días	35 días	41 días	45 días
pH del barro no sembrado	5,5	5,2	6,3	6,9	7,0	7,3	7,6	7,7	7,8
pH del barro sembrado	6,9	7,1	7,5	7,6	7,7	7,9	7,9	8,0	8,0

ENSAYO N° 3

Se empleó una muestra de barro recibida el 7 de Septiembre. Se hizo una primera extracción de muestra a los dos días de iniciada la digestión, con el fin de descubrir una posible exaltación de la actividad lítica. También al final del ensayo, para mayor exactitud de los resultados, se extrajeron muestras cada dos días.

Los resultados fueron los siguientes :











Tiempo de digestión : 2 días											
Cepa	Ensayo en agar	Ensayo en caldo nutritivo Dilución									
		10	2 10	3 10	4 10	5 10	6 10	7 10	8 10	9 10	10 10
<i>S. paratyphi</i> A	4 +	4 +	4 +	4 +	4 +	4 +	3 +	3 +	3 +	3 +	3 +
<i>S. paratyphi</i> B	3 +	3 +	3 +	2 +	2 +	2 +	2 +	2 +	2 +	+	+
<i>Sh.dysenteriae</i>	4 +	4 +	4 +	4 +	4 +	4 +	4 +	4 +	3 +	3 +	3 +
<i>E. coli</i>	4 +	3 +	3 +	3 +	2 +	2 +	2 +	2 +	2 +	+	+
Tiempo de digestión : 5 días											
<i>S. paratyphi</i> A	4 +	4 +	4 +	4 +	3 +	3 +	3 +	3 +	3 +	3 +	3 +
<i>S. paratyphi</i> B	3 +	3 +	3 +	2 +	2 +	2 +	2 +	2 +	+	+	+
<i>Sh.dysenteriae</i>	4 +	4 +	4 +	4 +	4 +	4 +	4 +	4 +	3 +	3 +	3 +
<i>E. coli</i>	3 +	3 +	2 +	2 +	2 +	2 +	2 +	2 +	2 +	+	+
Tiempo de digestión : 7 días											
<i>S. paratyphi</i> A	4 +	4 +	3 +	3 +	3 +	3 +	3 +	3 +	3 +	3 +	3 +
<i>S. paratyphi</i> B	3 +	3 +	2 +	2 +	2 +	2 +	2 +	2 +	+	+	+
<i>Sh.dysenteriae</i>	4 +	4 +	4 +	4 +	4 +	4 +	4 +	3 +	3 +	3 +	3 +
<i>E. coli</i>	3 +	3 +	2 +	2 +	2 +	2 +	2 +	2 +	+	+	+
Tiempo de digestión : 11 días											
<i>S. paratyphi</i> A	4 +	4 +	3 +	3 +	3 +	3 +	3 +	3 +	3 +	2 +	2 +
<i>S. paratyphi</i> B	3 +	2 +	2 +	2 +	2 +	2 +	2 +	+	+	+	+
<i>Sh.dysenteriae</i>	4 +	4 +	4 +	4 +	4 +	4 +	3 +	3 +	3 +	3 +	3 +
<i>E. coli</i>	3 +	2 +	2 +	2 +	2 +	2 +	+	+	+	+	+

Tiempo de digestión : 15 días											
Cepa	Ensayo en agar	Ensayo en caldo nutritivo Dilución									
		10	2 10	3 10	4 10	5 10	6 10	7 10	8 10	9 10	10 10
S. paratyphi A	3 +	3 +	3 +	3 +	3 +	3 +	2 +	2 +	2 +	2 +	2 +
S. paratyphi B	3 +	2 +	2 +	2 +	2 +	+	+	+	+	+	+
Sh.dysenteriae	4 +	4 +	4 +	4 +	4 +	4 +	3 +	3 +	3 +	3 +	3 +
E. coli	3 +	2 +	2 +	2 +	+	+	+	+	+	+	+
Tiempo de digestión : 20 días											
S. paratyphi A	3 +	3 +	3 +	3 +	2 +	2 +	2 +	2 +	2 +	2 +	+
S. paratyphi B	2 +	2 +	2 +	+	+	+	+	+	+	+	+
Sh.dysenteriae	4 +	4 +	4 +	4 +	3 +	3 +	3 +	3 +	3 +	2 +	2 +
E. coli	2 +	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tiempo de digestión : 25 días											
S. paratyphi A	3 +	3 +	3 +	2 +	2 +	2 +	2 +	2 +	2 +	+	+
S. paratyphi B	2 +	2 +	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sh.dysenteriae	4 +	4 +	4 +	3 +	3 +	3 +	3 +	2 +	2 +	2 +	2 +
E. coli	2 +	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tiempo de digestión : 30 días											
S. paratyphi A	3 +	3 +	3 +	2 +	2 +	2 +	2 +	+	+	+	+
S. paratyphi B	2 +	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Sh.dysenteriae	3 +	3 +	3 +	2 +	2 +	2 +	2 +	2 +	2 +	2 +	+
E. coli	2 +	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-



Tiempo de digestión : 48 días											
Cepa	Ensayo en agar	Ensayo en caldo nutritivo Dilución									
		10 <sup>1</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>9</sup>	10 <sup>10</sup>
S. paratyphi A	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
S. paratyphi B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sh.dysenteriae	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
E. coli	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tiempo de digestión : 50 días											
S. paratyphi A	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S. paratyphi B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sh.dysenteriae	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
E. coli	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

A los 52 días de digestión no hubo lisis con ningún filtrado.

Determinaciones químicas

	Barro fresco (Muestra III)	Barro digerido 1 mes	Barro digerido 44 días
<u>Humedad</u>	91,87 %	92,50 %	92,87 %
<u>Sólidos totales</u>	8,13	7,50	7,13
<u>Sólidos volátiles</u>	64,33	57,81	51,83
<u>Cenizas</u>	35,67	42,19	48,17

	Barro sembrado II *	Barro digerido 1 mes	Barro digerido 52 días
<u>Humedad</u>	95,02 %	96,79 %	97,65 %
<u>Sólidos totales</u>	4,98	3,21	2,35
<u>Sólidos volátiles</u>	57,83	43,81	33,27
<u>Cenizas</u>	42,17	56,19	66,73

\* mezcla de 2 partes en peso de barro fresco (muestra III) y una parte de barro maduro (muestra I digerido 3 meses), basado en la materia volátil.

Variación del valor del pH durante la digestión

(pH inicial del barro no sembrado : 6,0)  
 " " " " sembrado : 7,0)

Tiempo de digestión	2 días	5 días	7 días	11 días	15 días	20 días	25 días	30 días
<u>pH del barro no sembrado</u>	5,7	5,5	5,4	5,3	5,9	6,3	6,9	7,3
<u>pH del barro sembrado</u>	7,0	7,1	7,1	7,2	7,5	7,6	7,7	7,8

Tiempo de digestión	35	40	42	44	46	48	50	52
<u>pH del barro no sembrado</u>	7,6	7,7	7,7	7,8	-	-	-	-
<u>pH del barro sembrado</u>	7,8	7,8	-	7,9	7,8	7,9	7,9	8,0

En este tercer ensayo la variación observada del poder lítico, resultó en general, semejante a la del ensayo anterior. La actividad lítica del barro no sembrado en digestión se anuló totalmente a los 44 días, y la del barro sembrado, a los 52 días

#### ENSAYO Nº 4

Una muestra de 5 litros de barro cloacal recibida el 4 de Noviembre fué dividida en dos porciones de 2 litros cada una, reservándose 1 litro para las determinaciones previas a la digestión. A una de las porciones se la sembró con barro maduro (muestra I digerida 5 meses a 55°C) en la proporción de 2 partes de barro fresco con una parte de barro maduro, basado en la materia volátil. El barro no sembrado y el sembrado se pusieron a digerir a 55° el 6 de Noviembre y se sacaron muestras para la determinación de bacteriófagos, al comienzo cada 2 días y al final del ensayo (conocido aproximadamente por el ensayo Nº 1) cada día.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes :

#### Digestión a 55° de la muestra IV

Barro fresco : Muestra IV											
Cepa	Ensayo en agar	Ensayo en caldo nutritivo dilución									
		10	2	3	4	5	6	7	8	9	10
S. paratyphi A	4 +	4 +	4 +	3 +	3 +	3 +	3 +	3 +	3 +	3 +	3 +
S. paratyphi B	3 +	3 +	3 +	3 +	3 +	3 +	3 +	3 +	2 +	2 +	2 +
Sh.dysenteriae	4 +	4 +	4 +	4 +	4 +	4 +	4 +	4 +	4 +	4 +	3 +
E. coli	3 +	3 +	2 +	2 +	2 +	2 +	+	+	+	+	+





Tiempo de digestión : 10 días											
Cepa	Ensayo en agar	Ensayo en caldo nutritivo Dilución									
		10 <sup>1</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>9</sup>	10 <sup>10</sup>
S. paratyphi A	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
S. paratyphi B	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Sh.dysenteriae	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
E. coli	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tiempo de digestión : 11 días											
S. paratyphi A	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
S. paratyphi B	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Sh.dysenteriae	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
E. coli	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tiempo de digestión : 12 días											
S. paratyphi A	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S. paratyphi B	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sh.dysenteriae	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
E. coli	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

A los 13 días de digestión no hubo lisis con ningún filtrado.





Tiempo de digestión : 12 días											
Cepa	Ensayo en agar	Ensayo en caldo nutritivo Dilución									
		10	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>9</sup>	10 <sup>10</sup>
S. paratyphi A	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
S. paratyphi B	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Sh.dysenteriae	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
E. coli	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tiempo de digestión : 13 días											
S. paratyphi A	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
S. paratyphi B	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sh.dysenteriae	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
E. coli	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tiempo de digestión : 14 días											
S. paratyphi A	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S. paratyphi B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sh.dysenteriae	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
E. coli	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

A los 16 días de digestión, ningún filtrado acusó actividad lítica.

De modo que en el barro no sembrado en digestión a 55° se observó la anulación de toda actividad lítica a los 13 días, y en el barro sembrado, a los 16 días.

Determinaciones químicas

	Barro fresco (Muestra IV)	Barro digerido a 55° 15 días	Barro sembrado III *	Barro digerido a 55° 15 días
<u>Humedad</u>	92,77 %	93,34 %	95,95 %	97,31 %
<u>Sólidos totales</u>	7,23	6,66	4,05	2,69
<u>Sólidos volátiles</u>	69,43	63,42	57,53	42,35
<u>Cenizas</u>	30,57	36,58	42,47	57,65

\* Mezcla de 2 partes de barro fresco (muestra IV) y una parte de barro maduro (muestra I digerida a 55° durante 5 meses) basado en la materia volátil.

Variación del valor del pH durante la digestión a 55°

(pH inicial del barro no sembrado : 6,0)

(pH " " barro sembrado : 7,2)

Tiempo de digestión	2 días	4 días	6 días	9 días	10 días	11 días	12 días	13 días	14 días
<u>pH del barro no sembrado</u>	5,9	6,4	6,7	7,1	7,2	7,3	7,3	7,4	7,5
<u>pH del barro sembrado</u>	7,2	7,6	8,0	8,1	8,1	8,1	8,2	8,2	8,2

El barro empleado para la siembra (muestra I digerida a 55° durante 5 meses) presentó las siguientes características :

<u>Humedad</u> :	97,38 %
<u>Sólidos totales</u> :	2,62 %
<u>Sólidos volátiles</u> :	43,25 %
<u>Cenizas</u> :	56,75 %

### 3) Supervivencia de las bacterias de los grupos coli-salmonella en los barros en digestión

Con el objeto de investigar la acción bactericida durante el proceso de digestión del barro cloacal, se determinó la supervivencia del *S. paratyphi* A, *S. paratyphi* B y del *E. coli* (tipo I) en barro en digestión a 37°C. (\*).

Para ello tres porciones de 200 cc de barro cloacal fresco colocados en sendos frascos Erlenmeyer de 250 cc de capacidad, fueron inoculados con 0,5 cc de un cultivo de 24 horas en agua de peptona de *S. paratyphi* A, *S. paratyphi* B y *E. coli* (tipo I) respectivamente, conteniendo alrededor de  $1 \times 10^7$  bacterias. También se ensayó con una mezcla de dos partes de barro fresco y una parte de barro digerido, basado en la materia volátil, que fué infectada artificialmente en la misma forma.

Cada frasco Erlenmeyer se proveyó de un tubo de desprendimiento con agua, y se colocaron en la estufa a 37°C.

Cada dos días se extrajeron muestras de barro para investigar la supervivencia de cada especie bacteriana.

Para la búsqueda del *S. paratyphi* A y B se siguió la técnica recomendada por los Dres. : José J. Monteverde y Raúl Ferramola en los "Anales de la Sociedad Científica Argentina" : 133, - 417, 1942, empleando como medios de aislamiento el de Kristensen,

---

(\*) Se omitió la investigación de la supervivencia de las bacterias del grupo disentérico debido a las dificultades técnicas para su aislamiento de un medio tan rico en flora bacteriana como lo es el barro cloacal. Por otra parte, es notoria la escasa resistencia que presenta el *Sh. dysenteriae* para sobrevivir en los líquidos contaminados.

Lester y Jürgens (agar-verde brillante) y el agar-lactosa-tornasol, y además el medio líquido de enriquecimiento de Kauffmann-Müller (doble concentración) a base de verde brillante y tetratio natio de sodio, procediéndose en la siguiente forma : con el an- sa se extrajo una pequeña cantidad de barro que se sembró sobre la superficie del agar-verde brillante y con el material que que- daba aún en el ansa se sembró la superficie del agar-lactosa-tor- nasol; un cc de la misma muestra se mezcló en un tubo de ensayo con 9 cc del medio de Kauffmann, y todo fué colocado en la estu- fa a 37°C. A las 24 horas de incubación se examinaron las placas, y las colonias sospechosas presentes en el agar-lactosa-tornasol fueron tomados con un ansa y extendidas sobre agar inclinado que se incubó a 37° por 24 horas. La depa desarrollada se sometió a las pruebas serológicas para su identificación. En los casos en que no se obtuvieron en las placas de agar-lactosa-tornasol colo- nias bien aisladas, se hizo un reaislamiento del agar-verde-bri- llante, pescando las colonias sospechosas, que se suspendieron en agua de peptona y se volvieron a sembrar sobre agar-verde-brillan- te y agar-lactosa-tornasol. Cuando hubo desarrollo en el medio - de Kauffmann, se sembró con un ansa sobre agar-verde-brillante y agar-lactosa-tornasol, se incubó por 24 horas a 37°C y las colo- nias sospechosas, bien aisladas, se pasaron a agar inclinado y se practicaron las pruebas serológicas de aglutinación correspondien- tes, en la siguiente forma : con el cultivo en agar se hizo una - suspensión densa en solución fisiológica, y se depositó una gota del mismo (antígeno) sobre otra gota del suero aglutinado corres- pondiente, en una lámina de vidrio; se mezcló bien con ayuda del ansa y se observó al aglutinoscopio.

La investigación del E. coli (tipo I) se hizo con el me- dio de Mc Conckey, agregando 10 cc de la muestra de barro a un tu- bo conteniendo 10 cc del medio de Mc Conckey doble y haciendo di-

luciones del barro en Mc Conckey simple, desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-4}$ . Todo se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$ . Si a las 24 horas se observaba desarrollo y formación de gas, se pasaba con un ansa una gota de cada uno de los líquidos a otros tantos tubos con 9 cc del medio de Mac - Conckey simple, que eran incubadas a  $44^{\circ}$  durante 48 horas. Si en tonces se observaba desarrollo con formación de gas, se daba como prueba de la existencia de E. coli (tipo 1).

Los resultados obtenidos fueron los siguientes :

En el barro crudo no sembrado el S. paratyphi A sobrevivió durante 4 días; el ensayo efectuado el sexto día dió negativo. En el barro sembrado, el S. paratyphi A pudo aún ser aislado el sexto día, no encontrándose el octavo día de incubación.

En cuanto al S. paratyphi B se mostró menos resistente, sucumbiendo en ambos casos después del segundo día de digestión.

El E. coli presentó una mayor supervivencia : en el barro fresco no sembrado pudo ser encontrado hasta el  $28^{\circ}$  día de digestión, y en el barro sembrado, hasta el  $32^{\circ}$  día.

La menor supervivencia de los gérmenes en el barro fresco en digestión respecto al barro sembrado, podría atribuirse a la marcada acidificación que sufre el barro sin sembrar, como resultado del proceso de digestión, y que crea un medio poco apropiado para la vida de los microorganismos ensayados.

Los resultados obtenidos indican que el proceso de digestión de los barros ejerce una marcada acción germicida contra los microorganismos patógenos.



4) Repartición del bacteriófago en las fases  
sólida y líquida del barro

Con el objeto de determinar si existe la misma concentración de bacteriófagos en la fase líquida y sólida del barro cloacal, se hicieron dos ensayos con dos muestras de barro, procediendo en la siguiente forma : con una cantidad suficiente de barro se centrifugó a 18.000 r.p.m. de manera de separar los sólidos - cloacales del líquido; éste se decantó y los sólidos se suspendieron en la correspondiente cantidad de agua estéril. Luego de haber ajustado el pH, se procedió con el líquido cloacal y con los sólidos cloacales en la forma ya descrita para aislar el bacteriófago e investigar su actividad lítica.

Los ensayos se hicieron con bacteriófagos para *S. paratyphi A* y *S. paratyphi B*.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes :

---

Ensayo N° 1

Fase sólida del barro cloacal											
Cepa	Ensayo en agar	Ensayo en caldo nutritivo Dilución									
		10 <sup>10</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>9</sup>	10 <sup>10</sup>
S. paratyphi A	4 +	4 +	4 +	4 +	4 +	3 +	3 +	3 +	3 +	3 +	2 +
S. paratyphi B	4 +	4 +	3 +	3 +	3 +	3 +	2 +	2 +	2 +	2 +	+
Fase líquida del barro cloacal											
S. paratyphi A	3 +	2 +	2 +	2 +	2 +	+	+	+	+	-	-
S. paratyphi B	2 +	2 +	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<u>Ensayo N° 2</u>											
Fase sólida del barro cloacal											
S. paratyphi A	4 +	4 +	4 +	3 +	3 +	3 +	3 +	3 +	3 +	2 +	2 +
S. paratyphi B	4 +	3 +	3 +	3 +	2 +	2 +	2 +	2 +	+	+	+
Fase líquida del barro cloacal											
S. paratyphi A	3 +	3 +	2 +	2 +	+	+	+	+	-	-	-
S. paratyphi B	2 +	2 +	2 +	2 +	+	+	+	-	-	-	-

Se observó, pues, una mayor concentración de bacteriófago en la fase sólida que en la fase líquida del barro cloacal. Esto se debería a la adsorción que ejercerían las partículas sólidas del barro sobre los corpúsculos bacteriófagos.

### III) DISCUSION DE LOS RESULTADOS

Las muestras ensayadas de barros cloacales, procedentes de Wilde, presentaron un gran poder lítico contra el *Shigella dysenteriae* (Shiga 6), *S. paratyphi A*, *S. paratyphi B* y el *E. coli*, en ese orden.

Se observó que el proceso de digestión de los barros cloacales ejerce una acción deletérea para las bacterias y los bacteriófagos, siendo esta acción mucho más acentuada frente a las bacterias. Es decir, que los bacteriófagos se mostraron mucho más resistentes que las correspondientes bacterias y sobrevivieron por mucho más tiempo en barro en digestión.

El barro sembrado (en la proporción de una parte en peso de barro digerido y dos partes de barro fresco, sobre la fase de la materia volátil) permitió una corta prolongación de la actividad lítica, respecto del barro no sembrado en digestión.

En la digestión a 55°, el poder lítico del barro se anuló mucho antes que en la digestión a 37°.

En la digestión del barro fresco no sembrado, a 37°, la disminución de la actividad bacteriofágica es más rápida durante los primeros 10-15 días, haciéndose luego menos pronunciada y volviéndose a acentuar en los últimos días en que se observa aún actividad lítica. En cambio, en la digestión del barro sembrado, la disminución de la actividad lítica es lenta desde el comienzo para acentuarse en los últimos días. Esto se explicaría por la acidificación que sufre el barro sin sembrar durante la primera etapa de la digestión y que aceleraría la destrucción del bacteriófago.

La falta del medio apropiado para la lisis, sobre todo durante la etapa ácida de la digestión del barro no sembrado, la -

adsorción que sufre el bacteriófago por parte de las partículas sólidas en suspensión en el barro, y su destrucción como consecuencia del proceso de digestión, abogarían por la no intervención del bacteriófago en la purificación que tiene lugar durante la digestión del barro cloacal.

---

#### IV) CONCLUSIONES

1) Durante el proceso de digestión de los barros cloacales, la actividad lítica disminuye paulatinamente hasta anularse por completo.

2) En la digestión a 37° la capacidad lítica del barro fresco no sembrado se anula al cabo de unos 45 días y la del barro sembrado alrededor de los 50 días.

3) En la digestión a 55° el poder lítico del barro fresco no sembrado se anula alrededor de los 13 días y el del barro sembrado a los 15 días.

4) Respecto a la velocidad de disminución de su acción lítica, los cuatro bacteriófagos ensayados presentaron pequeña diferencia; el fago que perduró más fué el anti-Shiga, siguiéndole en orden de menor resistencia, el anti-S. paratyphi A y B y el anti-E. coli.

5) En un ensayo con barros artificialmente infectados con S. paratyphi A, S. paratyphi B y E. coli, se observó una marcada acción germicida durante la digestión a 37°. En el barro no sembrado, el S. paratyphi A inoculado no pudo ser aislado al sexto día de digestión y en el barro sembrado no se lo encontró al octavo día. El S. paratyphi B, en ambos casos sucumbió después del segundo día de digestión. El E. coli ensayado pudo sobrevivir hasta el 28° día de digestión en barro cloacal crudo y hasta el 32° día en barro sembrado.

6) Los sólidos en suspensión del barro cloacal tienen una mayor concentración de bacteriófagos que la fase líquida del mismo, separada por centrifugación y decantación.

---

V) RESUMEN

Se investigó la variación de la actividad bacteriofágica para bacterias de los grupos coli-salmonella-disentérico y la supervivencia de bacterias de los grupos coli-salmonella durante el proceso de digestión a 37° y 55°C de barro cloacal.

Los ensayos se efectuaron con muestras de barro cloacal de la ciudad de Buenos Aires procedentes de la Estación de Bombas de Wilde y obtenidas por sedimentación directa del líquido cloacal.

Para el aislamiento del bacteriófago se empleó el siguiente método : la muestra de barro, cuyo pH fué ajustado previamente a un valor próximo a 7,5, fué adicionada de caldo nutritivo y enriquecida con un cultivo joven de la bacteria susceptible. Luego de incubar a 37° durante 24 horas se filtró primero por papel de filtro y luego por bujía Berkefeld W.

La actividad lítica se ensayó con la técnica de las diluciones en serie del filtrado en caldo nutritivo (hasta la dilución  $10^{10}$ ) y subsiguiente siembra con un cultivo joven de bacterias y por la acción de una gota del filtrado original sobre una capa uniforme en agar en cajas de Petri de un cultivo de la bacteria susceptible.

La investigación de las bacterias del grupo salmonella se hizo empleando como medio de enriquecimiento el de Kauffmann-Müller (doble concentración); y como medio de aislamiento el de Kristensen, Lester y Jürgens (agar verde brillante) y el agar lactosa-tornasol. Para el E. coli (tipo I) se empleó el medio de Mc Conckey.

Durante todos los ensayos de digestión de los barros se

observó una gradual disminución de la actividad bacteriofágica - hasta su anulación completa y una rápida desaparición de las bacterias ensayadas.

-----oo-----

*Jimmie Sabae*

# FORRA

## VI) BIBLIOGRAFIA

- (1) - Imhoff : Eng. News 75, 14, 1916.
- (2) - O' Shaughnessy, F.R. : Journ. Soc. Chem. Ind. 33, 3, 1914.
- (3) - Imhoff : Eng. News-Record 75, 52, 1916.
- (4) - Rudolfs, W., Heukelekian, H., y Zeller, A. : Am. Jour. Pub. Health 16, 365, 1926.
- (5) - Fischer, Anthony J. : Sew. Works Jour. 1, 236, 1929.
- (6) - Zack y Edwards : Sew. Works Jour. 1, 160, 1929.
- (7) - Rudolfs, W. : Public Works 59, 483, 1928.
- (8) - Heukelekian, H. : Sew. Works Jour. 2, 313, 1930.
- (9) - Keefer, C.E. y Kratz, H. : Eng. News-Record 106, 474, 1931.
- (10) - Rudolfs, W. : Public Works 58, 19, 1927.
- (11) - Fair, G.M. y Carlson, C.L. : Eng. News-Rec. 99, 881, 1927.
- (12) - Heukelekian, H. y Heinemann, B. : Sew. Works Jour. 11, 426, 1939.
- (13) - Baity : New Jersey Sewage W. Assn. pg. 27, 1926. s/Sew. Works Jour. 1, 160, 1929.
- (14) - Rudolfs, W. : Ind. Eng. Chem. 19, 241, 1927.
- (15) - Heukelekian, H. : Sew. Works Jour. 2, 219, 1930.
- (16) - Marshall Lundie : Surveyor 78, 165, 1930.
- (17) - Rudolfs, W. y Heukelekian, H. : Ind. Eng. Chem. 22, 96, 1930.
- (18) - Rudolfs, W. : Sew. Works, Jour. 3, 19, 1931.
- (19) - Rudolfs, W. y Heukelekian, H. : Ind. Eng. Chem. 23, 67, 1931.
- (20) - Keefer, C.E. y Kratz, H. : Sew. W. Jour. 5, 262, 1933.
- (21) - Fischer, A.J. : Sew. W. Jour. 4, 44, 1932.
- (22) - Heukelekian, H. : Sew. W. Jour. 5, 757, 1933.
- (23) - Fair, G.M. y Moore, E.W. : Sew. W. Jour. 6, 3, 1934.
- (24) - Fair, G.M. y Moore, E.W. : Sew. W. Jour. 9, 3, 1937.



# BIBLIOGRAFÍA

- (25) - Neave, S.L. y Buswell, A. M. : Ind. Eng. Chem. 19, 233, 1927.
- (26) - Pearson, E.L. y Buswell, A.M. : Ind. Eng. Chem. (Anal.Ed.) 3, 359, 1931.
- (27) - Bach, H. : Sew. W. Jour. 3, 561, 1931.
- (28) - Winslow, C. y Belcher, D. : J. Inf. Dis. 1, 170, 1904.
- (29) - Gaub, W. : N.J. Agr. Exp. Sta. Bull. 394, año 1923. s/J. Bact. 19, 269, 1930.
- (30) - Hotchkiss, M. y Murray, T.J. : Am. J. Pub. Health 13, 562, 1923.
- (31) - Hotchkiss, M. : J. Bact. 9, 437, 1924.
- (32) - Shaetzle, T.C. : Eng. News-Rec. 93, 919, 1924.
- (33) - Greer, F.E. : Am. J. Pub. Health 15, 860, 1925.
- (34) - Heukelekian, H. : J. Bact. 14, 55, 1927.
- (35) - Ruchhoft, C.C., Kallas, J.G., y Edwards, G.P. : J. Bact. 19, 269, 1930.
- (36) - Heukelekian, H. y Heinemann B. : Sew. W. Jour. 11, 436, 1939.
- (37) - Twort, F.W. : Lancet, 2, 1241, 1915.
- (38) - D'Herelle, M.F. : C. Rend. Acad. Sc. 165, 373, 1917.
- (39) - D'Herelle, M.F. : C. R. Soc. Biol. 81, 1160, 1918.
- (40) - D'Herelle, M.F. : C. R. Soc. Biol. 90, 25, 1924.
- (41) - Kabéshima, T. : C. R. Soc. Biol. 83, 219, 1920.
- (42) - Bordet, J. y Ciuca, M. : C. R. Soc. Biol. 83, 1293, 1920.
- (43) - Bordet, J. y Ciuca, M. : C. R. Soc. Biol. 83, 1296, 1920.
- (44) - Bablet, J. : C. R. Soc. Biol. 83, 1322, 1920.
- (45) - Salimbeni; C. R. Soc. Biol. 83, 1545, 1920.
- (46) - Maisin, J. : C. R. Soc. Biol. 84, 467, 1921.
- (47) - Bruynoghe, R. : C. R. Soc. Biol. 85, 258, 1921.
- (48) - Bachmann, A. y Aquino, L.I. : C. R. Soc. Biol. 86, 1108, 1922.

# P E N A

- (49) - Pico, C.E. : C. R. Soc. Biol. 86, 1106, 1922.
- (50) - Pico, C.E. : C. R. Soc. Biol. 87, 836, 1922.
- (51) - Combiesco, D. : C. R. Soc. Biol. 87, 17, 1922.
- (52) - Bail, O. : Wien. Klin. Woch, 35, 765, 1922.
- (53) - Hauduroy, P. : C. R. Soc. Biol. 88, 59, 1923.
- (54) - Da Costa Cruz, J. : C. R. Soc. Biol. 89, 759, 1923.
- (55) - Fejgin, B. y Supniewski, J. : C. R. Soc. Biol. 89, 1385, 1923.
- (56) - Olsen, O. y Yasaki, J. : Klin. Wochenschr. 2, 1879, 1923.
- (57) - Mc Kinley, Earl B. : J. Lab. Clin. Med. 9, 185, 1923.
- (58) - Bronfenbrenner, J. y Korb, C. : J. Exp. Med. 41, 73, 1925.
- (59) - Hadley, P. : J. Inf. Dis. 42, 263, 1928.
- (60) - Plantureux, E. : C. R. Acad. Sc. 190, 224, 1930.
- (61) - Asheshov, I.N., Asheshov, I., Khan, S. y Lahiri, M.N. : Ind. J. Med. Res. 20, 1101, 1933.
- (62) - Luria, S.S., Melbrück, M. y Amerson, T.F. : J. Bact. 46, 57, 1943.
- (63) - Bachmann, A. : La Prensa Médica Arg. 8, 325, 1922.
- (64) - Arnold, Lloyd : Am. J. Pub. Health 15, 950, 1925.
- (65) - Ferretti, G. : Boll. Ist. Sierot. Milan, 5, 385, 1926.
- (66) - Stewart, A.D. y Ghosal, S.C. : Ind. J. Med. Res. 17, 1215, 1930.
- (67) - Rakieten, M.L., Eggerth, A.H., y Rakieten, T.L. : Jour. Bact. 40, 529, 1940.
- (68) - Moizo, M.C. : Tesis presentada a la F.C.M. de Buenos Aires. Año 1943.
- (69) - Flu, P.C. : Proc. Acad. Sci. Amsterdam 26, 116, 1923.
- (70) - Arloing, F. y Sempé : C. R. Soc. Biol. 94, 191, 1926.
- (71) - Monteiro, L. : C. R. Soc. Biol. 95, 994, 1926.
- (72) - Fabry, Paul : Rev. Hyg. med. Prév. 50, 667, 1928.
- (73) - Renaux, M.S. : Bull. Acad. Roy. Méd. Belg. 9, 432, 1929.

# P O P H A

- (74) - Beckwith, T.O., y Rose, Edythe J. : Jour. Bact. 20, 151, 1930.
- (75) - Stewart, A. D. y Ghosal, S.C. : Ind. J. Med. Res. 16, 989, 1929.
- (76) - Khan, S. : Ind. J. Med. Res. 18, 361, 1930.
- (77) - Stewart, A.D., y Ghosal, S.C. : Ind. J. Med. Res. 19, 137, 1931.
- (78) - Segre, S. : Boll. Ist. sierot. milanese 9, 22, 1930.
- (79) - Violle, H. : C. R. Soc. Biol. 108, 89, 1931.
- (80) - Gildemeister, S. y Watanabe, H. : Gesundh. Ing. 55, 241, 1932.
- (81) - Vagedes, K. v. : Zbl. Bakt. Parasitenk Abb. I, Orig. 1932, 126, 287. s/Pub. Health Eng. Abs. 14, W, 29, 1934.
- (82) - Beard, Paul J. : Jour. Inf. Dis. 52, 420, 1933.
- (83) - Goldie, H. : Rev. Hyg. Med. Prév. 55, 5, 1933.
- (84) - Sievers, O. : Z. Hyg. 1934, 116, 15. s/Pub. Health Eng. Abs. 15, S, 72, 1935.
- (85) - Couture, E. : Rev. Hyg. Med. Prév. 58, 371, 1936.
- (86) - Sangiorgi, G. : Boll. Sez. Ital. Soc. Intern. Microbiol. 8, 35, 1936.
- (87) - Rhodes, A.J., y Indlan, M. : Jour. Hyg. 39, 658, 1939.
- (88) - Kligler, J. : Med. Res. Monog. N<sup>o</sup> 15, 75, 1921. s/Eng. News-Record 92, 198, 1924.
- (89) - Wolman, A. : Eng. News-Rec. 92, 198, 1924.
- (90) - Gray, A. : Brit. Med. Jour. 1, (Jan. 26), 142, 1929.
- (91) - Wilson, W.J. y Blair : Brit. Med. Jour. 2, 560, 1933.
- (92) - Heukelekian, H. : Sew. Jour. 5, 774, 1933.
- (93) - Ruchhoff, C.C. : Sew. W. Jour. 6, 1054, 1934.
- (94) - Neri, F. : Ann. D'Igiene 44, 297, 1934.
- (95) - Heukelekian, H. y Schulhoff, H.B. : N. Jersey, Agr. Exp. Sta. Bull. N<sup>o</sup> 589, June, 1935.