

Tesis de Posgrado

Determinación del bacteriófago como índice de contaminación de aguas

Mignone, Raúl Marcelo

1954

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. 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. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Mignone, Raúl Marcelo. (1954). Determinación del bacteriófago como índice de contaminación de aguas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0815_Mignone.pdf

Cita tipo Chicago:

Mignone, Raúl Marcelo. "Determinación del bacteriófago como índice de contaminación de aguas". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1954. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0815_Mignone.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Universidad Nacional de Buenos Aires.

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

Resumen de la Tesis presentada para optar al Título
de Doctor en Química por:

RAUL MARCELO MIGNONE.

1 9 5 4

Res. de Basis: 815

FCEFA

DETERMINACION DE BACTERIOFAGO COMO INDICE DE CONTAMINACION DE AGUAS

Se ha estudiado la presencia de bacteriófago como índice de contaminación de aguas. Guelin en 1943 aplicó una técnica para la resolución del problema, mediante el enriquecimiento de diluciones crecientes de muestras con un cultivo de *Esch. coli* poliespecífico para bacteriófagos específicos contra enterobacterias. Trabajando con muestras de agua del Río Marne observó que había un paralelismo entre la variación de la contaminación por el bacteriófago y el *Esch. coli*.

El complejo bacteria-bacteriófago puede ser considerado desde dos puntos de vista distintos: uno tomando a la bacteria como portadora, hecho éste extremadamente común, sobre todo en las provenientes del intestino animal y el otro de acuerdo a los recientes conocimientos de lisogenia. La fuente sería siempre el intestino animal, siendo el vehículo el líquido cloacal en distintas formas.

La determinación de fagos específicos para bacterias patógenas, se hará empleando bacterias seleccionadas que acusen sólo la presencia de determinado fago, para concluir con ello en forma indirecta la contaminación del agua por tal microorganismo específico del fago.

El objeto de este trabajo es valorar la técnica de Guelin frente a distintos tipos de aguas, su sensibilidad y la posible aplicación de ella al estudio de contaminación de aguas semisurgentes. En su desarrollo se ha realizado un estudio comparativo entre el método modificado de E. S. Wilson (actualmente practicado en la Direc-

ción Principal de Laboratorios de O.S.N.) y la técnica original de Guelin.

Se aislaron y purificaron fagos específicos contra algunos géneros de la familia de la Enterobacterias y se seleccionaron cultivos de *Esch. coli* provenientes de agua del Río de la Plata, decantada del Establecimiento Gral. San Martín, Río Luján, líquido cloacal de la ciudad de Buenos Aires con el fin de encontrar cepas sensibles a los fagos específicos de distintas enterobacterias.

Se estudia la especificidad de los distintos cultivos frente a distintas preparaciones de fagos específicos para algunos de los mismos cultivos ensayados.

Se establecieron las condiciones de trabajo, diluyente a usar, tiempo de enriquecimiento y temperatura de inactivación de las bacterias.

Debido a la presencia natural de enterococos en algunas muestras de agua del Río de la Plata, se estudió la posibilidad de su inhibición o eliminación durante el enriquecimiento de las muestras, mediante el cristal violeta; a pesar de las altas concentraciones de enterococos ensayadas no existió ninguna dificultad en la lectura de los resultados. Como dato interesante surgió la sensibilidad del fago a la acción del colorante. También se ensayó la filtración previa de la muestra de agua por bujía Berkefeld W, dada la complicación que se ocasionaba y los resultados poco eficientes obtenidos no se ahondó más en mejorar la técnica.

Se estudiaron muestras de aguas del Río de la Plata, decan-

tada del establecimiento Gral. San Martín y de pozos semisurgentes(1).

En aguas del Río de la Plata, el bacteriófago fué encontrado en todas las muestras, aunque se observó que en todos los casos fué identificado en diluciones menores que la que permitió evidenciar a las bacterias coliformes. Con respecto al Esch. coli tipo I en 4 muestras fué posible identificar a ambos hasta la misma dilución.

También se observa la presencia de fagos específicos para algunas bacterias patógenas tales como: S. newport, S. anatum, S. paratyphi B, Esch. coli, tipo 026 y Esch. coli, tipo 055.

Del ensayo de muestras de aguas decantada surge también una diferencia de sensibilidad entre la investigación de fago y de bacterias coliformes. En dos muestras se pudo identificar al fago y al Esch. coli tipo I en la misma dilución. En esta serie se encontró el hecho interesante de que en una muestra con coliformes totales < 2 contenía fago con un N.M.P./100 de 7,2.

Se examinan 50 muestras de aguas de pozos semisurgentes variando la contaminación en coliformes de < 2 hasta un valor indeterminado de > 240 . Sólo en tres ocasiones se identificó fago. La aplicación de la técnica de investigación de fago no es recomendable en aguas semisurgentes debido al alto porcentaje de muestras bacteriológicamente inaptas en las cuales no se puede poner en evidencia partícula fágica alguna (698).

(1) El estudio se hizo determinando comparativamente la contaminación por su contenido en bacteriófago capaz de lisar al Esch. coli, cepa 36 y otras bacterias seleccionadas y mediante la aplicación de la técnica oficial de O.S.N.

Se planeó un ensayo con el objeto de determinar si existía en una muestra contaminada, fago específico frente a alguna de las bacterias que ella contenía.

Esta experiencia dió resultado negativo, lo que otorgaría al Esch. coli cepa 36 mayor importancia como bacteria indicadora.

Se estudió la sensibilidad de la técnica determinándose el número mínimo de partículas de fagos que era posible poner en evidencia; del cual surge el resultado de que excepto para el fago propagado sobre el Esch. coli cepa 36, en los restantes ensayados pueden identificarse en concentración tan reducida como una partícula.

Como conclusión se puede establecer que en aguas del Río de la Plata, la técnica en estudio es menos sensible que la adoptada por O.S.N., sin embargo se cree interesante aportar más datos sobre el particular. Lo mismo se puede observar para agua decantada.

La irregularidad de los resultados obtenidos se acentúa más en las muestras de aguas de pozos semisurgentes. Hasta tener un mayor número de datos se concluye que la técnica de determinación de la contaminación en este tipo de agua por el bacteriófago no es recomendable.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

DETERMINACION DEL BACTERIOFAGO COMO INDICE DE CONTAMINACION DE AGUAS

Trabajo de Tesis para optar al título
de Doctor en Química

presentado por:

RAUL MARCELO MIGLIOME

1954

Tesis 815

Agradezco al Dr. Enrique Savino, por honrarme con el patrocinio de ésta Tesis.

Mi reconocimiento al Dr. Rogelio Tralles, Director Principal de Laboratorios y al Dr. Raúl Ferramola, Jefe del Departamento de Asesoramiento Químico y Microbiológico, de los Laboratorios de Obras Sanitarias de la Nación por permitirme efectuar en los mismos éste trabajo.

Al Dr. Osvaldo A. Pese el más sincero agradecimiento por sugerirme el tema y guiado en su realización.

DETERMINACION DEL BACTERIOFAGO COMO INDICE DE CONTAMINACION

DE AGUAS

Plan de Trabajo

- 1) Introducción
- 2) Antecedentes
- 3) Aislamiento y purificación de fagos específicos
- 4) Selección de cultivos específicos a emplearse en el estudio de aguas.
- 5) Examen de las condiciones óptimas de trabajo.
- 6) Determinación comparada de la contaminación de distintos tipos de aguas mediante identificación de bacterias coliformes y del bacteriófago.
- 7) Discusión de los resultados obtenidos.
- 8) Conclusiones.

CAPITULO I

I N T R O D U C C I O N

El bacteriólogo está empeñado en suministrar a la población aguas de bebida que tal como lo establecen las legislaciones sanitarias sean bacteriológicamente potables, es decir, carezcan de microorganismos patógenos.

Entre las enfermedades de origen hídrico se pueden mencionar: fiebre tifoidea, disentería bacilar y amebiana, salmonelosis, shigelosis, cólera, etc.

El tratar de buscar los microorganismos causantes de estas enfermedades en aguas, es una tarea que no es corriente en los laboratorios ya que debido a su poca viabilidad en dicho medio, se encuentran en número reducido y durante corto tiempo, requiriendo su búsqueda técnicas especiales.

Así, las shigelas mantenidas durante 3 días a 5° C. su número se reduce a alrededor del 10 % de las bacterias originariamente presentes (1).

Por su parte Guelin (2) estudió la supervivencia de S. typhi Vi 4 en aguas no esterilizadas y demostró que en superficie desaparecían a los 3 días, aumentando la supervivencia en profundidad y en aguas esterilizadas.

Entre otros factores que intervienen en la disminución del número de bacterias en aguas se puede mencionar: la sedimentación, luz solar, tipo y concentración de sustancias nutritivas, actividad de otros microorganismos, temperatura, presencia de bacteriófagos, etc.

Dadas las dificultades anotadas, no se trata de buscar directamente a los microorganismos patógenos, excepto en casos especiales

sino que el estado sanitario del agua se establece mediante procedimientos indirectos. Se utiliza para ello como índice de contaminación la presencia de bacterias integrantes de la flora normal del intestino humano y animal, de mayor resistencia en el habitat investigado.

Dichas bacterias son las conocidas como del grupo coli-intermediario - aerógenas (3). Su presencia en el agua hace que se la considere potencialmente peligrosa.

El uso de gérmenes coliformes como índice de contaminación ha sido adoptado por todos los países ya que es un medio seguro y práctico para determinar la contaminación de origen fecal. Sin embargo, no se hallan libres de críticas y algunos autores han tratado de reemplazarlos.

Así tenemos que entre otros, se ha sugerido la búsqueda de enterococos (4), bacterias normales del intestino humano y animal, de mayor resistencia y que no se multiplican en el agua indicando así una contaminación más reciente y peligrosa.

Queda aún por estudiarse un método sencillo que permita identificar bacterias patógenas rápidamente y con sensibilidad suficiente para ser aplicado en aguas superficiales purificadas en las provenientes de pozos semisurgentes. El que mejor parece cumplir con estas exigencias es el de filtración por membranas filtrantes (5) aún de cuestionable aplicación en nuestro país. Es así que se buscó en la bibliografía reciente con el objeto de hallar una técnica que responda al problema planteado.

CAPITULO II

ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

En 1943 Guelin (6) aplicó una técnica nueva a la resolución del problema de la investigación de la contaminación del agua.

En efecto, mediante el enriquecimiento de diluciones crecientes de las muestras, con un cultivo de Esch. coli poliespecífico para bacteriófagos específicos contra enterobacterias, determinó la dilución mayor en la cual se podía apreciar este último. De esta forma tenía datos cuantitativos sobre su contenido en las muestras ensayadas.

Encontró así, trabajando con agua del Río Marne que existía un paralelismo entre la variación de la contaminación por el bacteriófago y el Esch. coli. A medida que se progresaba hacia la costa, las muestras evidenciaban mayor contenido en bacteriófagos, al tiempo que crecía la contaminación bacteriana.

Trató más tarde (7, 8) de aplicar esta técnica al estudio de contaminaciones específicas. Primeramente mediante un cultivo de S. typhi Vi determinó el contenido de fago específico para este microorganismo. La especificidad y actividad de dichos fagos se mantenía con pequeñas variantes en un valor constante con el transcurso del tiempo aunque tendía a una inactivación.

En 1947 (9) estudió el contenido de fago específico para el Clostridium parfringens encontrando que estaba íntimamente relacionado a la contaminación bacteriana.

Es un hecho conocido (10) que el complejo bacteria-bacteriófago puede ser estudiado desde dos puntos de vista distintos.

Uno considerando a la bacteria como portadora de fago, hecho extremadamente común sobre todo en las provenientes del intestino animal y el otro a la luz de los conocimientos recientes de lisogenia, es decir, de bacterias capaces de generar fagos (11).

Es indudable que la presencia de fagos específicos para determinadas bacterias en el agua, debe atribuirse a cualquiera de esos dos fenómenos. La fuente sería siempre el intestino animal, siendo el vehículo el líquido cloacal en distintas formas.

Ahora bien, teóricamente es posible suponer y veremos más adelante que razón da la práctica a esto, que la incorporación de bacterias causantes de enfermedades hídricas a un agua traerá consigo la incorporación de sus fagos específicos.

Bastará entonces emplear bacterias seleccionadas que acusen sólo la presencia de determinado fago para investigar a éstos y concluir de ello en forma indirecta la contaminación del agua por tal microorganismo específico del fago.

Esta hipótesis se basa en dos suposiciones. Primero que las bacterias patógenas incorporan bacteriófagos y segundo de la existencia de bacterias lo suficientemente específicas como para ser lisadas sólo por un fago y por ningún otro.

La primera suposición se basa en un hecho experimental. Boyd (12) del estudio de un cierto número de cultivos de S. typhimurium concluyó que prácticamente todas eran portadoras de fagos específicos.

Cabe determinar sin embargo, si la viabilidad del fago en el agua se mantendría lo suficiente como para permitir su identificación.

La respuesta se tendrá solamente de ensayos prácticos y mediante el estudio de aguas, cuya historia reciente indique contaminación.

El valorar la técnica de Guelin frente a distintos tipos de aguas, su sensibilidad, y la posible aplicación de ella al estudio de contaminación de aguas semisurgentes, ha sido el objeto de este trabajo. En su desarrollo se ha realizado un estudio comparativo entre el método modificado de E.S. Wilson (actualmente practicado en la Dirección Principal de Laboratorios de O.S.H.) y la técnica original de Guelin.

CAPITULO III

BACTERIOFAGO

Se conoce como bacteriofagia al fenómeno por el cual ciertas partículas no visibles al microscopio (bacteriófagos) infectan la célula bacteriana produciendo como signo más notable la lisis de ella.

Un primer hecho significativo, posiblemente debido a la presencia de bacteriófagos lo tendríamos en la comprobación de Hankin (13) en 1876 de la progresiva depuración de las aguas de los ríos Jumna y Ganger. Supuso dicho autor que ese poder antiséptico del agua se debía a una sustancia volátil ya que era eliminada por la ebullición aunque se conservaba después de filtrar el agua.

El descubrimiento del bacteriófago se atribuye a Twort (1915) y a d^o Herelle (1917) y es conocido por ello como "fenómeno Twort-d'Herelle".

Twort (14) observó el fenómeno curioso que en cultivos de micrococcos aparecían áreas transparentes libres de desarrollo bacteriano. Determinó que dicha propiedad era transmisible, es decir, bastaba infectar con material proveniente de zonas transparentes sendos cultivos de la misma bacteria, para que luego de un período de incubación se repitiera el fenómeno.

claras y llamó al agente bacteriolítico que las producían " bacteriophageum intestinale o protobio bacteriophagum". Confirmó para el mismo las propiedades del agente activo de T wort.

d'Herelle sostuvo la teoría de que las zonas transparentes eran colonias de bacteriófago y emitió la hipótesis acerca de la naturaleza discontinua del mismo. Para la comprobación de ésta realizó experiencias de diluir el principio productor de lisis de tal modo de tener por cada ml 10^{-10} del mismo y agregó 1 ml de esta dilución a 10 tubos con 9 ml de cultivo bacteriano. Luego de incubar observó la presencia del bacteriófago sólo en 3 tubos, con lo que demostró que el agente lítico era de tipo corpuscular.

Propiedades del Bacteriófago.

Ya se adelantó que una de las primeras propiedades que se determinó en ellos fué su filtrabilidad, comportándose así como los virus animales y vegetales.

Su tamaño puede ser determinado por filtración a través de membranas de poro conocido. Lepine, Nicole y Giuntini (16) mediante la ultracentrífuga determinaron los siguientes valores: bacteriófagos subtilis: 66-72 $m\mu$; C_{16} : 54-60 $m\mu$; Streptococo B 563: 24-28 $m\mu$; C_{36} : 21-25 $m\mu$; S_{13} : 18-20 $m\mu$.

Por lo que respecta a su morfología Luria y Anderson (17) consiguieron determinar mediante el microscopio electrónico que los bacteriófagos T₂ del Esch. coli B presentaban un cuerpo más o menos esférico de estructura granulosa con una prolongación en forma de cola de una longitud aproximadamente igual al diámetro de aquel.

Relacionado con el tamaño de la partícula fágica se encuentra el tamaño del área de lisis (placa). En efecto, Anderson(18) y otros autores demostraron que había una relación inversa entre las dimensiones de la partícula del fago y el tamaño de la placa de lisis por él producida. Los fagos pequeños darían placas grandes y los fagos de mayor tamaño darían placas pequeñas.

Los bacteriófagos son más resistentes a la temperatura que las bacterias, siendo característico para cada fago su temperatura de inactivación. Esta propiedad se aprovecha para la esterilización de los cultivos tal como se verá más adelante.

Son resistentes a concentraciones bajas de determinados agentes químicos como la acetona, cloroformo, tolueno, etc., aunque no a los aldehídos por los cuales son inactivados.

Los rayos ultravioletas así como las radiaciones visibles son deletéreos para los bacteriófagos. En efecto, Guelin (19) trabajando con los fagos S_{13} y C_{16} estableció que son sensibles a la acción de los rayos luminosos visibles. Los rayos activos parecen encontrarse en la región del violeta y del azul. La destrucción fué atribuida a fenómenos de oxidación.

Ya que se trata de agentes vitales compuestos principalmente de nucleoproteínas no es sorprendente el hecho de que sean capaces de producir anticuerpos. Es decir, los bacteriófagos tienen propiedades antigénicas. Los anticuerpos específicos neutralizan su acción como efecto visible, y ello constituye una técnica valiosa para su estudio.

Los bacteriófagos T para Esch. coli B se pueden dividir serológicamente en 4 grupos que incluyen los fagos: T 1 al 1^o; T2, T4 y T6 al 2^o; T3 y T7 al 3^o y el último al fago T5.

Hasta ahora hemos enunciado las propiedades que caracterizan en forma general a la partícula de fago.

Vemos ahora las propiedades del sistema fago-huésped. Un primer estudio empleando el fago T1 frente al *Esch. coli* B fué realizado por Purk, Garen y Chino (20) quienes concluyeron que el fago T1 no atacaba a la bacteria cuando el líquido diluyente era agua destilada, sin embargo, mediante el agregado al sistema de determinados cationes podía lograrse que lo hiciera y aún controlarse la velocidad de ataque variando la composición cualitativa y cuantitativa.

Entre los iones estudiados figuran el Ca^{++} , Mg^{++} , Ba^{++} , Mn^{++} , Na^+ , K^+ y NH_4^+ ; por su parte el Al^{+++} , Cr^{+++} , Fe^{+++} tienen acción destrérea para el fago.

Más tarde Anderson (21) observó la influencia del l-triptofano como co-factor en la formación de las placas, hecho al que también contribuye la fenilalanina, tirosina y otros aminoácidos.

Con la base de los conocimientos sobre la acción de determinadas sustancias en la acción lítica y mediante la técnica de neutralización por sueros específicos se estudió cinéticamente todo el proceso lítico concluyéndose que contaba de tres fases principales:

Una primera fase de adsorción sobre el huésped, o fase en la cual influyen los cationes y aminoácidos mencionados y durante la cual el número de partículas no aumenta y por el contrario disminuye de la suspensión para fijarse a la bacteria.

La segunda fase (período latente) que correspondería al crecimiento intracelular y durante la cual tampoco aumenta el número de partículas.

La última fase del proceso consiste en la ruptura de la cé-

lula y la liberación de las partículas con el consiguiente aumento de fago.

Cada una de las dos primeras fases se cumplen en un tiempo determinado y específico para cada fago frente a su huésped homólogo. El aumento del número de partículas luego de realizado el proceso es en reglas generales también constante para cada fago.

Dan una idea de los tiempos requeridos en las fases citadas los siguientes valores: período de adsorción fagos T1, T3, T7 aproximadamente 10 mn; período latente fagos T2, T4, T6 21-23 mn; T1, T3, T7: 13 mn y T5: 40 mn; todos ellos frente al Esch. coli B, bacteria para la cual son específicos (22).

El número de partículas producidas varía de 120 a 400 aproximadamente.

Cada una de estas etapas fué visualizada con el microscopio electrónico (23).

Otro hecho relacionado al sistema fago-huésped es el conocido como fenómeno de interferencia (24). Este consiste en líneas generales en que cuando dos virus no relacionados serológicamente son adsorbidos por una misma bacteria, sólo uno de ellos es liberado luego en la lisis. La mutua exclusión, no es siempre absoluta. Así cuando T1 y T5 son simultáneamente adsorbidos por el Esch. coli B el 4 % de las bacterias liberan a ambos. Alcanzando hasta el 90 % de las células infectadas con T2 y T4 ó T2 y T6.

Con respecto a la invariabilidad de las propiedades de los fagos digamos que pueden sufrir mutaciones, las cuales a semejanza de las que sufren las bacterias y los restantes virus, modifican la especificidad del huésped, el tipo de placa y los requerimientos de co-fac-

tores específicos. Del mismo modo que en los microorganismos citados estas mutaciones sólo afectan a un limitado y pequeño número de células o partículas y puede ponerse en evidencia sólo cuando se favorece su proliferación a costa de la forma madre.

Con todos estos antecedentes vemos ahora como puede caracterizarse un bacteriófago. Para ello pueden tenerse en cuenta cada una de las siguientes propiedades que son específicas y en general invariables (sobre este particular nos referiremos someramente más adelante).

- 1) Tamaño y morfología de la partícula.
- 2) Constitución antigénica.
- 3) Temperatura de inactivación y susceptibilidad a los agentes físicos y químicos.
- 4) Espectro de bacterias sensibles.

CAPITULO IV

PARTE EXPERIMENTAL

A) Aislamiento y purificación de fagos específicos.

Se utilizó para ello líquido cloacal de la ciudad de Buenos Aires. Este material llegó al laboratorio a las pocas horas de ser extraído y se procedió a su cultivo dentro de las 2 horas de su llegada. Para ello primeramente se lo filtró por papel de filtro de poro grueso y luego se midieron 90 ml en sendos frascos de 250 ml agregándole 10 ml de caldo nutritivo 1º veces concentrado (A I) (ver apéndice) y 0,5 ml de un cultivo en agua de peptona (A II) de 24 h de incubación a 37º C de la cepa cuyo fago se deseaba aislar. Hecho esto se incubó a 37º C durante 24 h. Se filtró por filtro Seitz e bujía Berkefeld W; se practicó una prueba de esterilidad y se guardó a 4º C hasta su purificación. Para ello se han usado las siguientes técnicas:

a) En medio líquido:

Para ello se prepararon una serie de 12 tubos de ensayo conteniendo 9 ml de caldo nutritivo (A III) cada uno.

Se agregó al primer tubo 1 ml de la preparación de fago a purificar mezclando bien y pasando 1 ml de la dilución obtenida al tubo siguiente y así sucesivamente hasta el décimo tubo del cual una vez bien mezclado se desechó 1 ml. De esta forma se tuvieron 10 tubos conteniendo 9 ml cada uno de diluciones decrecientes al décimo de fago.

Al tubo Nº 11 se le agregó 1 ml de la preparación de fago con el objeto de determinar una posible contaminación.

A todos los tubos excepto el N° 11 se agregó 1 ml de suspensión bacteriana diluida de tal forma de agregar entre 1000 y 5000 bacterias por tubo. El tubo N° 12 contenía solamente cultivo bacteriano y caldo sirviendo de control de crecimiento en ausencia de fago.

Se incubó a 37° C. durante 18-20 hs. y los dos tubos que correspondían a la mayor dilución de fago y que presentaban ausencia de desarrollo se filtraron por bujía Berkefeld W, empleándose el filtrado para una nueva dilución. El proceso se repitió 3 veces más tras lo cual la suspensión de fago se consideró puro.

TU.O N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Caldo nutri- tivo (ml)	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
Preparación de fago	1	Mezclar y pesar sucesivamente 1 ml de- sechando 1 ml del tubo N° 10									1	-
Cultivo bacte- riano 1.000- 5.000/ml	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-	1

b) En medio sólido:

Debido a que en un buen número de casos la técnica anterior era un poco confusa por la implantación de bacterias resistentes al fago que sobrevivían a las lisadas y desarrollaban en el caldo, se la reemplazó por otra que eliminaba dicho inconveniente. Debemos decir aquí que la mayor parte de los cultivos puros se presentan heterogeneos en su sensibilidad al fago.

La purificación en medio sólido fué hecha según dos técnicas distintas, de las cuales debido a su eficacia se recomienda la que sigue (25): a 2,5 ml de agar estéril al 0,7 % fundido y mantenido a

46-48° C, se agregó 1 gota de una suspensión de bacterias (obtenida agregando 2 ml de caldo nutritivo a un cultivo en agar inclinado de 24 h a 37° C.) y 1 ml de diluciones al décimo de fago en agua destilada estéril.

La mezcla de bacterias y fago se volcó sobre sondas cajas de Petri con agar nutritivo (B I) previamente secadas 2 hs a 37° C. Se trató siempre de obtener una buena distribución del agar con las bacterias y el fago sobre la superficie del agar nutritivo.

Se observó que no era conveniente mantener durante mucho tiempo el agar a 48° C, pues gelificaba y dificultaba la observación.

Se incubaron las cajas a 37° C., 24 h; al cabo de este tiempo se observaron placas aisladas de fago. Se aisló una de dichas placas con un poco del cultivo circundante a un tubo de caldo nutritivo. Se incubó éste a 37° C durante 24 h. Se procedió entonces a destruir las bacterias mediante calentamiento a 58° C, durante 30 minutos y con la suspensión de fago así obtenida se repitió el aislamiento. El fago aislado de esta segunda experiencia se consideró puro y se mantuvo en heladera a 4° C.

La otra técnica que se empleó consistió en lo siguiente:

Se prepararon cajas de Petri con agar nutritivo (B I) y se secaron a 37° C, durante 2 horas. Una vez secas se distribuyó sobre áreas de aproximadamente 1 cm², con un ensa de 6 mm de espesor, tal como se indica en la figura A, el cultivo bacteriano a ensayar. Dicho cultivo en caldo era de unas 6 horas de incubación a 37° C.



FIGURA A

Se cuidó que la distribución de las bacterias fuese uniforme y sin lastimar el agar. Se dejó secar perfectamente y sobre cada uno de los extendidos se depositó una gota de suspensión de fago o sus diluciones al décimo en agua destilada. En este caso no se distribuyó el fago sino que se dejó extender sola la gota depositada. Se aguardó que estuviera seca e invirtiendo la caja se la incubó a 37° C durante 18-20 h.

Sobre cada caja se probaron 6 diluciones de fago y se hicieron dos controles, uno de esterilidad, colocando una gota de fago tal cual y un control de desarrollo del cultivo sin agregado de fago.

En la fotografía N° 1 se puede observar el aspecto de una de dichas placas.

Del extendido que mostrara placas de fago más aisladas se aisló una de ellas cuidando de tomar una pequeña cantidad de cultivo y se cultivó en caldo nutritivo durante 18-20 h a 37° C. Al cabo de dicho

tiempo se calentó para eliminar las bacterias y se procedió a una nueva dilución y ensayó en placa.

El material aislado de este segundo tratamiento se consideró puro y se mantuvo también en heladera.

B) Selección de cultivos de Esch. coli

Con el objeto de seleccionar cultivos de Esch. coli que fueran sensibles a los fagos específicos para distintas enterobacterias se procedió a aislar bacterias coliformes de muestras de agua de: Río de la Plata, decantada del Establecimiento Gral. San Martín, Río Luján, Arroyo de la Cruz (Feia. de Bs. Az.) y de líquido cloacal en la ciudad de Buenos Aires.

Para ello se sembraron diluciones crecientes de cada muestra en sendos tubos de caldo lactosado (A IV) provistos de empujita de Durham. Se incubó a 37° C durante 48 h. se aisló en cajas de Petri conteniendo agar eosina-azul de metileno.

Las cajas se incubaron 24 h. a 37° C y se aisló de cada una a agar inclinado, 5 colonias que presentaban brillo metálico. Los cultivos se incubaron 24 h. a 37° C y de ellos se volvió a aislar esta vez sobre agar nutritivo (B I) contenido en cajas de Petri. Este segundo aislamiento se hizo para tener seguridad de contar con un cultivo puro.

Las cajas se incubaron a 37° C, 24 h. y se aisló a agar inclinado una o más colonias bien aisladas. Los tubos de agar inclinado una vez incubados a 37° C, 24 h. constituyeron cultivos puros que fueron posteriormente identificados bioquímicamente.

C) Reacciones bioquímicas.

Las reacciones que se practicaron sobre cada cultivo son las que se indican a continuación.

Producción de indol: Se sembró en sencillos tubos conteniendo agua de triptona (A V) y se incubó a 37° durante 72 h. Al cabo de dicho tiempo se agregó a cada cultivo 0.2-0.3 ml. de reactivo de Kovacs (C I). Se agitó y se dejó en reposo unos minutos. Cuando había indol la capa superior con el reactivo tomaba un color rojo intenso.

Producción de acetilacetilcarbinol: Cada uno de los cultivos en estudio se sembraron en sencillos tubos conteniendo agua de peptona-glucosa-fosfato (A VI) y se incubaron a 37° C durante 72 h. Se practicó entonces la modificación de Barrit de la reacción de Voges-Proskauer (26). Para ello se colocó 1 ml de cultivo en un tubo bien limpio y se agregó 0.5 ml de solución al 16 % de HOK (e III), se mezcló por agitación y se agregó 0.5 ml de sol. alcohólica de α -naftol al 6 % (e III). Se agitó durante unos minutos con el objeto de conseguir una buena aeración y se leyeron los resultados dentro de los 20 minutos de iniciada la prueba. En caso positivo se obtenía una coloración rojo cereza.

Producción de ácidos orgánicos: Se sembró en el mismo medio que para la identificación de acetil-metil-citrinol. Al cabo del mismo tiempo de incubación sobre 1 ml de cultivo se agregaron unas gotas de solución acuosa de rojo de metilo (e II). En caso positivo el indicador toma el color rojo, de viraje en la zona ácida.

Aprovechamiento del citrato de sodio : Se sembraron los cultivos en el medio de Koser (A VII), teniendo la precaución de sembrar con el asa recta para evitar la introducción de materia orgánica. Se incubó a 37° C, durante 72 h., observando cada día la presencia o ausencia de desarrollo.

Desarrollo y aprovechamiento de lactosa en caldo Mc Conkey a 44° C.

Se sembraron sendos tubos conteniendo caldo Mc Conkey y caspenita de Durham (VIII y IX). Se incubaron a 44° C. en baño de agua durante 48 h., observándose la presencia de gas.

Licuección de gelatina : Se sembraron por punción sendos tubos conteniendo gelatina nutritiva (B II). Se incubó a 37° hasta 15 días practicando lecturas diariamente con el objeto de observar la licuección del medio.

D) Técnica empleada en el estudio de la especificidad de los cultivos.

Se siguió con ligeras variantes la técnica en medio sólido empleada en la purificación de los bacteriófagos específicos procediéndose exactamente como se indicó en ella, hasta el extendido de los cultivos.

En cada caja se hicieron 3 extendidos de un mismo cultivo y sobre cada uno, una vez seco, se depositó un asa de cada uno de los distintos fagos sin diluir. Se dejó que la gota se extendiera y una vez seco se incubó a 37° C durante 24 h. En una caja aparte se probó la esterilidad de cada fago colocando un asa sobre la superficie del agar nutritivo.

Se expresaron los resultados como se indica a continuación:

- L.C. : lisis confluyente, áreas de lisis que ocupa toda la zona sobre la que se depositó el fago.
- L.S.C.: lisis semi-confluyente, áreas incompletas de lisis en la zona sobre lo que se depositó el fago.
- P () : placas de lisis aisladas. El número entre paréntesis indica su número.

Es de notar que se usó en todos los ensayos el fago sin diluir y que una reacción de pocas placas de lisis indica entonces una relación poco estrecha entre el bacteriófago y la bacteria. En la mayor parte de estos casos la repetición con el fago diluido no presentó evidencia de lisis.

B) Técnica general empleada en el estudio de muestras de agua.

Consistió en dos fases generales. Un enriquecimiento y un ensayo de presencia de fago en los cultivos enriquecidos.

Las porciones sembradas de cada tipo de agua figuran en el Cuadro N° 1. Las diluciones se hicieron en agua de peptona o agua destilada estéril, tal como se indicará más adelante.

Volúmenes iguales de muestra o dilución y de agua de peptona concentrada (A X) (27) se sembraron con 0,1 ml de suspensión bacteriana cuyo fago se investigaba y se incubó a 37° C durante 4 h.

La suspensión bacteriana se obtuvo suspendiendo en 2 ml de solución fisiológica estéril un cultivo en agar inclinado de 24 h a 37° C.

Mediante esta incubación previa los cultivos se enriquecieron en fago. Al cabo de ella se calentaron 30 minutos a 58-60° C en baño de agua con el objeto de destruir las bacterias ya que dicha temperatura no afectaba la viabilidad del fago.

Los cultivos así obtenidos se probaron frente a la bacteria que se usó en el enriquecimiento, usando para ello la técnica que se indicó para el estudio de la especificidad de los cultivos.

Luego de incubar las cajas 24 h. a 37° C. se practicaron las lecturas correspondientes, usando para ello la misma escala que se indicó en C). Ver Fotografía N° 2.

CUADRO N° 1

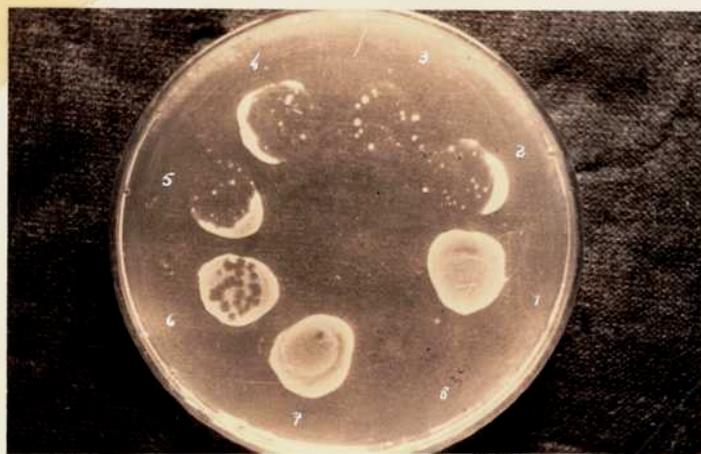
PORCIONES SEMBRADAS DE CADA TIPO DE AGUA PARA LA INVESTIGACION DE FAGO

TIPO DE AGUA	PORCIONES SEMBRADAS (ml.)					
	50	20	10	1	0,1	0,01
Agua del Río de la Plata	1	-	1	3	3	3
Agua decantada (Est. San Martín)	1	3	3	3	3	-
Agua de pozos semi-surgentes	2	3	3	3	-	-

F) Determinación de bacterias coliformes totales y de Esch. coli tipo I en las distintas muestras de agua estudiadas.

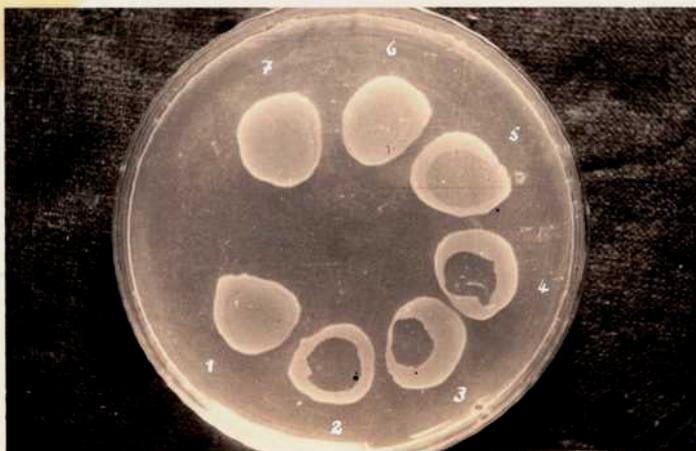
Sobre la misma muestra de agua que se recilda para ser estudiada en su contenido fágico se determinó el N. M. P./100 de bacterias

Fotografía Nº 1



- 1 - Control de cultivo sin fago
2 a 7 - Ensayo de diluciones crecientes de fago frente al cultivo específico
3 - Prueba de esterilidad del fago
2,3,4 y 5: Lisis confluyente
6 y 7: Placas grandes

Fotografía Nº 2



- 1- Control de cultivo sin fago
2 a 7 - Ensayos de suspensiones de fago provenientes de enriquecer cantidades decrecientes de agua con Esch. coli cepa 36 durante 4 h. a 37° C. y posterior calentamiento durante 30 minutos a 52-60° C.
2 a 4 : Lisis confluyente - 5: Lisis semiconfluyente

coliformes y el N.M.P./100 de Esch. coli tipo I.

Para ello se siguieron las técnicas de la Dirección Principal de Laboratorios de O.S.A. (28).

En sendos tubos de caldo Mc Conkey de doble concentración provistos de campanita de Durham para las porciones de 10 ml de la muestra, y de concentración simple para las porciones menores y sus diluciones, se sembraron las cantidades que figuran en el Cuadro N° 2.

CUADRO N° 2

PORCIONES SEMBRADAS DE LOS DISTINTOS TIPOS DE AGUA PARA LA INVESTIGACION DE COLIFORMES Y ESCH. COLI TIPO I

TIPO DE AGUA	PORCIONES SEMBRADAS (ml)				
	10	1	0,1	0,01	0,001
Agua del Río de La Plata	1	1	1	3	1
Agua decantada	2	1	2	-	-
Agua semisurgente	5	1	1	-	-

Los tubos así sembrados se incubaron a 37° C durante 48 h.; al cabo de dicho tiempo se anotó los tubos con gas y en base a ellos y de acuerdo a las tablas de probabilidad (29) se calculó el N.M.P./100 de bacterias coliformes.

De cada uno de los tubos que presentaban gas se hicieron dos pasajes. Uno a otro tubo con caldo Mc Conkey simple y provisto de campanita de Durham que una vez sembrado se incubó 48 h. a 44° C. en baño de agua y otro a un tubo de medio citrato de Koser (A VI) usando para ello un asa recta. Este último medio se incubó hasta 72 h.

a 37° C.

En base a los tubos que desarrollaban y aprovechaban la lactosa a 44° C. se calculó mediante tablas el N.M.P./100 ml de muestra de Esch. coli tipo I. En caso de carecer de dichas tablas este valor podía ser calculado mediante la fórmula siguiente:

$$\text{N.M.P./100 ml de Esch. coli tipo I} = x \frac{a}{a + b}$$

donde x = N.M.P./100 ml de coliformes

a = " " " " Esch. coli tipo I

b = " " " " Intermediario-aerógenos-cloacal

Del número de tubos que desarrollaban en medio citrato de Koser se calculó el N.M.P./100, de microorganismos integrantes del llamado grupo intermediario-aerógenos-cloacal (IAC).

El cálculo se efectuó mediante la fórmula:

$$\text{N.M.P./100 ml de IAC} = x \frac{a}{a + b}$$

donde x = N.M.P./100 ml de coliformes

a = " " " " I.A.C.

b = " " " " Esch. coli tipo I

CAPITULO V

RESULTADOS EXPERIMENTALES Y DISCUSION

1) Examen de las condiciones de trabajo

Se incluyen en este capítulo la elección del diluyente, el tiempo de enriquecimiento de los cultivos y la temperatura de inactivación de las bacterias.

a) Diluyente: Si bien la técnica original de Guellin preconizaba hacer las diluciones en agua de peptona (A II) se pensó que esta ejercería algún efecto de coloide protector sobre la partícula del fago. No obstante y con el objeto de simplificar la técnica se ensayó el empleo del agua corriente estéril para dicho fin.

Para ello sendas muestras de agua del Río de la Plata se sembraron por triplicado y de acuerdo con la técnica indicada anteriormente, practicando en un caso las diluciones con agua de peptona diluida y en el otro con agua corriente estéril.

En el cuadro N° 3 figuran los resultados obtenidos y de él surge que no aporta ningún beneficio en lo que a sensibilidad se refiere, el empleo del agua de peptona diluida. Por ello se decidió usar como diluyente el agua corriente estéril.

ron calentadas durante 30 minutos en baño de agua a 58° C. En el cuadro N° 4 figuran los resultados obtenidos y de él surge que el enriquecimiento prolongado no contribuye a aumentar la sensibilidad de la técnica y más aún tiende a dificultar las lecturas ya que durante las 24 h. a 37° C. desarrollan las bacterias esporuladas, cuyas esporas no se destruyen por calentamiento a 58° C.

Una variación que se experimentó y cuyos resultados figuran también en el cuadro N° 4, fué el de un calentamiento previo de la muestra durante 30 minutos a 58° C, su enriquecimiento a 37° C. durante 24 h. y calentamiento posterior igual que las muestras anteriores.

Este tratamiento no aportaba beneficios notables y como implicaba una complicación hacer dos calentamientos no se creyó provechosa su utilización.

- e) Temperatura de inactivación en las bacterias: Si bien el calentamiento a 58° C. durante 30 minutos en las muestras enriquecidas a 37° C. durante 4 h. fué eficiente en todos los casos, se trató de ver si un calentamiento a mayor temperatura durante el mismo tiempo aumentaba la sensibilidad de la técnica en muestras enriquecidas durante 24 h. Se supuso que podría existir una temperatura a la cual se suprimieran un mayor número de bacterias que de otra forma podrían desarrollar sobre el agar y sobreponerse a las zonas de lisis. Por otra parte, se investigó si la temperatura de 58° C. no era deletérea para el fago incluyéndose ensayos de calentamiento a temperaturas de 56° C., 60° y 62° C. durante 30 minutos. En el cuadro N° 5 figuran los resultados correspondientes y de él surge que el calentamiento a 56° C no llega a inactivar completamente a las bacterias lo que produce resultados confusos.

CUADRO N° 3

RESULTADOS OBTENIDOS CON DISTILOS DILUYENTES

CONDICIONES EXPERIMENTALES DE LOS ENSAYOS						TUBOS POSITIVOS PARA LAS SEMBRAS DE (1)			
Muestra N°	Tiempo enriquecim.	Temp. enriquecim.	Tiempo enlentam.	Temp. parat. cal.	Diluyente	50cc	10 cc	1cc	0,1cc
1	4 h.	37°C	30 m.	58°C	A.D.	-	-	1	-
	"	"	"	"	A.P.	-	-	1	1
2	"	"	"	"	A.D.	1	-	3	-
	"	"	"	"	A.P.	1	-	2	-
3	"	"	"	"	A.D.	3 (2)	3 (2)	1	-
	"	"	"	"	A.P.	(3)	(3)	2	-
4	"	"	"	"	A.D.	1	1	1	1
	"	"	"	"	A.P.	1	1	-	-
5	"	"	"	"	A.D.	1	1	3	-
	"	"	"	"	A.P.	1	1	3	1

(1) 1 cc, 0,1cc, 0,01 y 0,001 cc se sembraron por triplicado

(2) se sembraron por triplicado

A.D.: agua destilada estéril

A.P.: agua de pepton.

(3): no se sembró.

CUADRO N° 4

RESULTADOS OBTENIDOS AL EMPLEAR DISTINTOS TIEMPOS DE ENRI-
QUECIMIENTO CON O SIN CALENTAMIENTO PREVIO

CONDICIONES EXPERIMENTALES DE LOS MUESTRAS					TIEMPOS POSITIVOS PARA PORCIÓNES DISTINTAS DE:					
Muestra N°	Tiempo enriquecim.	Tiempo calentamiento	Temp. calentamiento	Calentamiento previo	50	10	1	0.1	0.01	0.001
1	24 h	30 m.	58°C	-	(1) L.C. (2) +	L.C. +	L.C. +	-	-	-
	4 h	"	"	-	L.C. +	L.C. +	L.C. +	-	-	-
2	24 h	"	"	-	L.C. +	L.C. +	L.C. +	-	-	-
	4 h	"	"	-	L.C. +	L.C. +	L.C. +	L.C. +	-	-
3	24 h	"	"	-	L.C. +	L.C. +	L.C. +	L.C. +	L.C. +	-
	4 h	"	"	-	L.C. +	L.C. +	L.C. +	L.C. +	-	-
4	24 h	"	"	+	L.C. +		L.C. +	L.C. +		
	24 h	"	"	-	L.C. +		L.C. +	P.M.	-	-
	4 h	"	"	-	L.C. +		L.C. +	-	-	-
5	24 h	"	"	+	L.C. +	P.M.	L.C. +	-		
	24 h	"	"	-	L.C. +	L.C. +	-	-	-	-
	4 h	"	"	-	L.C. +	-	-	-	-	-

Cuadro N 4(Continuación).

6	24 h	"	"	•	L.C. ♦	L.C ♦	L.C ♦	-	-	-
	4 h	"	"	-	L.C. 0	L.C 0	L.C 0	-	-	-
7	24 h	"	"	•	L.C. ♦	L.C ♦	L.C ♦	-	-	-
	4 h	"	"	-	L.C. 0	L.C 0	L.C 0	-	-	-

(1) Grado de lisis

(2) Eficacia del calentamiento

NOTACION: L.C. : lisis confluyente

P.M. : placas medianas

0, •, ••, •••, •••• : distinto grado de contaminación de los extendidos. Decreciente claridad de las observaciones.

CUADRO Nº 5

RESULTADOS OBTENIDOS EN ENSAYOS DISTINTAS TEMPERATURAS
DE INACTIVACION

CONDICIONES EXPERIMENTALES DE LOS ENSAYOS				TUBOS POSITIVOS PARA PORCIONES Semejantes de:					
Muestra Nº	Tiem- po en- rique- cim.	Tiem- po de con- ta- miento	Temp. con- ta- mien- to	50	10	1	0,1	0,01	0,001
1	24 h.	30 min.	56° C	L.C. ++++	L.C. ++	L.C. ++	-	-	-
	"	"	58° C	L.C. ++++	L.C. +	L.C. +	-	-	-
	"	"	60° C	L.C. ++++	L.C. ++	L.C. +	-	-	-
	"	"	62° C	L.C. ++	L.C. ++	L.C. +	-	-	-
	4 h.	"	58° C	L.C. +	L.C. +	L.C. 0	L.C. 0	-	-
2	24 h.	"	56° C	L.C. ++++	L.C. +++	L.C. +++	-	-	-
	"	"	58° C	L.C. ++++	L.C. +	L.C. ++	L.C. ++	L.C. +	-
	"	"	60° C	L.C. +	L.C. +	L.C. +	L.C. +	-	-
	"	"	62° C	L.C. +	L.C. +	-	-	-	-
	4 h.	"	58° C	L.C. 0	L.C. 0	L.C. 0	L.C. 0	-	-

Referencias: L.C. : lisis confluyente

0, +, ++, +++, +----: distinto grado de contami-
nación de los extendidos. Decreciente claridad de las observaciones.

Por su parte temperaturas superiores a 60° afecta la viabilidad del fago y por lo tanto la sensibilidad de la técnica.

Como entre 58° y 60° C los resultados eran claros y reproducibles, se eligió dicho intervalo de temperatura para inactivar los cultivos enriquecidos.

Aún aplicando los resultados obtenidos en las experiencias mencionadas, es decir, dilución de las muestras con agua estéril, enriquecimiento a 37° C, durante 4 hs. e inactivación de las formas vegetativas por calentamiento durante 30 minutos a 58°-60° C en un número limitado de casos la observación de las placas de lisis se vio dificultada por sobrecultivos bacterianos implantados sobre aquellas.

Mediante pruebas bioquímicas y serológicas se pudo identificar a dichas bacterias como Streptococcus faecalis (grupo enterococo). Este hecho no sorprendió porque era bien conocido que estos microorganismos son capaces de resistir un calentamiento de 1 h a 60° C, propiedad que los colocaba como gérmenes potencialmente molestos.

2) Experiencias conducentes a eliminar la interferencia de los enterococos.

Con el objeto de solucionar el problema de la interferencia de los enterococos se planeó su supresión mediante dos técnicas distintas.

Primero, ensayar el enriquecimiento de las muestras en presencia de una sustancia que inhibiera a los enterococos en una concentración tal que no afectara ni al Esch. coli cepa 36 ni al fago. Segundo, Filtrar las muestras por bujía Berkefeld W antes de su siembra.

Para aplicar la primera técnica nombrada fué elegido el cristal violeta (B IV) como sustancia inhibidora a incorporarse al medio de cultivo.

El primer paso era averiguar la concentración necesaria que matara (bactericida) a los enterococos y no afectara al Esch. coli cepa 36.

Para ello se plantearon una serie de experiencias de la siguiente forma. Se incorporó a sendas porciones de agua de peptonas (A II) distintos volúmenes de una solución de cristal violeta de modo de obtener una vez diluído al doble por mezcla con la muestra, las siguientes concentraciones de la droga: 200; 100; 40; 20; 10; 5 y 4 mgr/lt.

Se ensayó su acción sobre tres distintas concentraciones de enterococos : $1,2 \times 10^8$; $1,2 \times 10^6$ y $1,2 \times 10^4$ y sobre $4,3 \times 10^8$ de Esch. coli.

Se plantearon así cuatro experiencias mezclando volúmenes iguales de agua de peptonas conteniendo el cristal violeta y de corriente estéril conteniendo las cantidades de bacterias antes indicadas.

Se incubó a 37° C durante 4 h y al cabo de ellos se observó cuales ensayos presentaban desarrollo bacteriano.

Se anotó la menor concentración de cristal violeta que inhibía el desarrollo (acción bacteriostática). De los tubos sin desarrollo se pasó una gota a sendas cajas de Petri conteniendo agar nutritivo con el objeto de observar cual era la concentración mínima de colorante que ocasionaba la muerte de las bacterias (acción bactericida). En los Cuadros Nos. 6 y 7 figuran los resultados obtenidos.

CUADRO N° 6

RESULTADO OBTENIDO EN EL CULTIVO DE ST. PNEUMONIS EN
PRESENCIA DE CRISTAL VIOLETA

CONCENTRACION FINAL DE CRISTAL VIOLETA mgx/l.	Desarrolle en presencia del inhibidor. 24 h. a 37° C. (Acción bacteriostática)			DESARROLLO EN AGAR NUTRITIVO 24 h. a 37° C. (Acción bactericida)		
		$1,2 \times 10^8$	$1,2 \times 10^6$	$1,2 \times 10^4$	$1,2 \times 10^8$	$1,2 \times 10^2$

CUADRO Nº 7

RESULTADO OBTENIDO EN EL CULTIVO DE E. COLI, CEPA 36

EN PRESENCIA DE CRISTAL VIOLETA

CONCENTRACION FINAL DE CRISTAL VIOLETA mg. / l	DESARROLLO EN PRESENCIA DEL INHIBIDOR. 24 h. a 37° C. (Acción bacteriostática)	DESARROLLO EN AG. N. NUTRITIVO 24 h a 37° C (Acción bactericida)
	(1)	(2)
4	◆	◆
5	◆	◆
10	◆	◆
20	◆	◆
40	◆	◆
100	◆ -	Escaso
200	◆ -	May Escaso

(1) = Bacterias sembradas $4,3 \times 10^8$

(2) = " " " $4,3 \times 10^8$

De su observación se decidió ensayar las concentraciones de 40; 20 y 10 mgr/lit de cristal violeta pues ellas metaban o disminuían suficientemente el número de enterococos sin afectar al Esch. coli.

Para estudiar el enriquecimiento de muestras, se empleó agua del Río de la Plata. Cada experiencia contaba así con un control constituido por el agua tal cual, enriquecida con el agua de peptona sin cristal violeta; un segundo con un agua contaminada con un número conocido de enterococos enriquecidos en el mismo medio y esta última muestra enriquecida en agua de peptona adicionada de las tres concentraciones de cristal violeta elegidas.

Se sembraron las muestras en la forma habitual y los volúmenes por triplicado de 10; 1, 0,1 y 0,01 ml.

Las concentraciones de enterococos ensayadas fueron de 30.000 y 240.000 por 100 ml de agua.

Estos valores sobrepasan por exceso al valor medio presente en el agua del Río de la Plata que es según Leiguarda, Feso y Kempny (30) de 450/100 ml, encontrándose en una relación respecto al Esch. coli de 1/96.

Los resultados obtenidos figuran en los Cuadros Nos. 8 y 9 y de ellos surge que a pesar de las concentraciones altas de enterococos empleadas no existió ninguna dificultad en la lectura de los resultados lo que constituye un dato contrario a la experiencia obtenida con otras muestras contaminadas naturalmente.

Por otra parte de dichos cuadros surge el hecho interesante que el bacteriófago es sensible al cristal violeta hasta una concentración de 10 mgr/lit ya que los resultados obtenidos de muestras enriquecidas en agua de peptona adicionada de dicha concentración de

CUADRO Nº 8

ENSAYO DEL ENRIQUECIMIENTO DE MUESTRAS DE AGUA DEL RIO DE LA PLATA CONTAMINADAS CON 300 ENTEROCOCCOS POR ML. EN PRESENCIA DE DISTINTAS CONCENTRACIONES DE CRISTAL VIOLETA

MUESTRA	Concentración de cristal violeta adicionada mg./l.	Volúmenes sembrados (ml)										
		10			1			0,1		0,01		
Agua del Río de la Plata	-	L.C.	L.C.	L.C.	L.C.	P.C. (2)	L.C.	-	-	-	-	-
Agua del Río de la Plata contaminada con enterococos	-	L.C.	L.C.	L.C.	L.S.C	IC	L.C	-	-	-	-	-
"	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
"	20	-	-	P.M. (2)	-	-	-	-	-	-	-	-
"	10	L.C.	P.M. (5)	LSC	L.C.	IC	P.C ****	-	-	-	-	-

Referencias: Ver cuadro Nº 9

CUADRO Nº 9

ENSAYO DEL ENRIQUECIMIENTO DE MUESTRAS DE AGUA DEL RÍO DE LA PLATA CONTAMINADAS CON 2.400 ENTEROCOCOS POR HL. EN PLACAS DE DISTINTAS CONCENTRACIONES DE CRISTAL VIOLETA

MUESTRA	Concentración de cristal violeta edicio cada mg /l	Volúmenes sembrados (ml)											
		10		1		0,1		0,01					
Agua del río de la Plata	-	P.G(1) P.M(2)	P.M (1)	L.C	P.M. (10)	-	P.M. (50)	-	-	-	-	-	-
Agua del río de la Plata contaminada con enterococos	-	P.M (10)	L.C.	L.C	P.M. (40)	-	L.C.						
"	13,3	-	-	-	-	L.C	-	-	-	-	-	-	-
"	10	-	-	-	-	LSC	P.M. (30)	-	-	-	-	-	-

- Referencias: L.C. : lisis confluyente
 L.S.C. : lisis semiconfluyente
 P.M. : placas medianas, entre paréntesis se indica su número
 P.C. : placas chicas, entre paréntesis se indica su número.
 P.G. : placas grandes, entre paréntesis se indica su número.

colorante fueron menores que los controles.

Tal cual se indicó más arriba se ensayó también la filtración del agua antes de su enriquecimiento. Los resultados obtenidos figuran en el Cuadro N° 10.

De él surge que por filtración, a través de bujías Berkefeld W hay pérdida de bacteriófago posiblemente por absorción del mismo en el filtro.

Debido a su resultado poco eficiente y a la complicación que sería la filtración previa de la muestra no se siguió ahondando en la mejora de esta técnica aunque se pensó que filtrando primero un coloide (suero sanguíneo) o (solución de albúmina de huevo) y luego el agua el fenómeno de absorción se ampliaría.

Por otra parte en las experiencias destinadas a obtener la eliminación de la interferencia de los enterococos no se logró resultado útil pero de los cuadros nos. 8 y 9 surgió la impresión de que el problema no debía ser frecuente, pues es muy raro el caso de tener en un agua una concentración de enterococos mayor que la de 240,000/100 ml.

3) Ensayo de la polivalencia de los distintos cultivos ensayados.

De la observación del cuadro N° 11 surge que muy pocos son los cultivos útiles por su polivalencia. A pesar de ello se seleccionan algunos para completar una pequeña serie con cultivos obtenidos en el país. En el cuadro N° 12 figuran los cultivos seleccionados.

CUADRO Nº 10

RESULTADO DE LOS ENSAYOS DE FILTRACION DEL AGUA DEL RIO DE LA PLATA POR BUJIA BERKEFELD Y ANTES DE SU ENRIQUECIMIENTO

CONDICIONES EXPERIMENTALES DE LOS ENSAYOS					TUBOS POSITIVOS PARA PORCIONES SEMBRADAS DE ML. (1)					
MUESTRA Nº	Tiempo enriquecimiento	Tiempo calentamiento	Temp. calentamiento	Filtración por bujía	50	10	1	0,1	0,01	0,001
1	4 hs.	30 m	59° C	-	1	1	2	-	-	-
	"	"	"	•	1	1	-	-	-	-
2	"	"	"	-	1	3	3	-	-	-
	"	"	"	•	1	3	1	-	-	-

(1) 10 ml, 1 ml, 0,1 ml, 0,01 ml, 0,001 ml se sembraron por triplicado

D.C.
1888

-	L.C.	-	-
L.C.	L.C.	.	-
-	L.C.	-	-
-	L.C.	-	L.C.
-	L.C.	P.C. ---	L.C.

PLATE 11 (Continued)

<u>S. aureus</u> specimens pure	<u>Arch. coll</u> tipo 1 cepa 7	<u>Arch. coll</u> tipo 1 cepa 8	<u>Arch. coll</u> tipo 1 cepa 25	<u>Arch. coll</u> tipo 4 cepa 65	<u>Arch. coll</u> tipo 1 cepa 76
<u>S. nonparv</u>	P.C. +	-	-	-	-
<u>S. orientalis</u>	P.M.	-	P.C. +++	P.C. +++	L.C.
<u>S. lactis</u>	-	-	-	-	-
<u>S. typhi</u> V1	-	-	-	-	-
<u>Arch. coll, tipo</u> D.C.	L.C.	P.C. +++	P.C. +++	L.C.	L.C.
<u>S. paratyphi</u> A	-	-	-	-	-
<u>Arch. coll tipo</u> 1 deca 7	L.C.	-	-	-	-
<u>S. dysenteriae</u>	-	-	-	-	-
<u>S. boydii</u>	P.H. (1)	-	-	-	-

Legión. coli tipo 1 cep. 74	Legión. coli tipo 1 cep. 75	Legión. coli tipo 1 cep. 85	Legión. coli tipo 1 cep. 89	Intermedio tipo 1
-	-	L.C.	-	-
-	D.C. P.	-	P.H.	-
L.C.	-	L.C.	-	L.C.
-	-	-	-	-
-	D.C. P.	L.C.	L.C.	F.P.
-	-	-	-	D.C. P.
-	L.C.	-	-	-
-	-	-	-	-
-	-	-	L.C.	-

2000-10-10

TABLE II (continued)

Species of the Genus *Phycosphaera*

Phycosphaera sp. nov.

<u>Strain</u>	<u>Medium</u>	<u>Characteristics</u>	<u>Source</u>	<u>Reference</u>
<u>1</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>1</u>	<u>1</u>	<u>1</u>
<u>2</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>2</u>	<u>2</u>	<u>2</u>
<u>3</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>3</u>	<u>3</u>	<u>3</u>
<u>4</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>4</u>	<u>4</u>	<u>4</u>
<u>5</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>5</u>	<u>5</u>	<u>5</u>
<u>6</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>6</u>	<u>6</u>	<u>6</u>
<u>7</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>7</u>	<u>7</u>	<u>7</u>
<u>8</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>8</u>	<u>8</u>	<u>8</u>
<u>9</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>9</u>	<u>9</u>	<u>9</u>
<u>10</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>10</u>	<u>10</u>	<u>10</u>
<u>11</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>11</u>	<u>11</u>	<u>11</u>
<u>12</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>12</u>	<u>12</u>	<u>12</u>
<u>13</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>13</u>	<u>13</u>	<u>13</u>
<u>14</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>14</u>	<u>14</u>	<u>14</u>
<u>15</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>15</u>	<u>15</u>	<u>15</u>
<u>16</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>16</u>	<u>16</u>	<u>16</u>
<u>17</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>17</u>	<u>17</u>	<u>17</u>
<u>18</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>18</u>	<u>18</u>	<u>18</u>
<u>19</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>19</u>	<u>19</u>	<u>19</u>
<u>20</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>20</u>	<u>20</u>	<u>20</u>
<u>21</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>21</u>	<u>21</u>	<u>21</u>
<u>22</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>22</u>	<u>22</u>	<u>22</u>
<u>23</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>23</u>	<u>23</u>	<u>23</u>
<u>24</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>24</u>	<u>24</u>	<u>24</u>
<u>25</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>25</u>	<u>25</u>	<u>25</u>
<u>26</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>26</u>	<u>26</u>	<u>26</u>
<u>27</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>27</u>	<u>27</u>	<u>27</u>
<u>28</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>28</u>	<u>28</u>	<u>28</u>
<u>29</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>29</u>	<u>29</u>	<u>29</u>
<u>30</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>30</u>	<u>30</u>	<u>30</u>
<u>31</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>31</u>	<u>31</u>	<u>31</u>
<u>32</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>32</u>	<u>32</u>	<u>32</u>
<u>33</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>33</u>	<u>33</u>	<u>33</u>
<u>34</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>34</u>	<u>34</u>	<u>34</u>
<u>35</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>35</u>	<u>35</u>	<u>35</u>
<u>36</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>36</u>	<u>36</u>	<u>36</u>
<u>37</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>37</u>	<u>37</u>	<u>37</u>
<u>38</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>38</u>	<u>38</u>	<u>38</u>
<u>39</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>39</u>	<u>39</u>	<u>39</u>
<u>40</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>40</u>	<u>40</u>	<u>40</u>
<u>41</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>41</u>	<u>41</u>	<u>41</u>
<u>42</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>42</u>	<u>42</u>	<u>42</u>
<u>43</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>43</u>	<u>43</u>	<u>43</u>
<u>44</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>44</u>	<u>44</u>	<u>44</u>
<u>45</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>45</u>	<u>45</u>	<u>45</u>
<u>46</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>46</u>	<u>46</u>	<u>46</u>
<u>47</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>47</u>	<u>47</u>	<u>47</u>
<u>48</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>48</u>	<u>48</u>	<u>48</u>
<u>49</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>49</u>	<u>49</u>	<u>49</u>
<u>50</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>50</u>	<u>50</u>	<u>50</u>
<u>51</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>51</u>	<u>51</u>	<u>51</u>
<u>52</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>52</u>	<u>52</u>	<u>52</u>
<u>53</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>53</u>	<u>53</u>	<u>53</u>
<u>54</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>54</u>	<u>54</u>	<u>54</u>
<u>55</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>55</u>	<u>55</u>	<u>55</u>
<u>56</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>56</u>	<u>56</u>	<u>56</u>
<u>57</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>57</u>	<u>57</u>	<u>57</u>
<u>58</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>58</u>	<u>58</u>	<u>58</u>
<u>59</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>59</u>	<u>59</u>	<u>59</u>
<u>60</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>60</u>	<u>60</u>	<u>60</u>
<u>61</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>61</u>	<u>61</u>	<u>61</u>
<u>62</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>62</u>	<u>62</u>	<u>62</u>
<u>63</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>63</u>	<u>63</u>	<u>63</u>
<u>64</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>64</u>	<u>64</u>	<u>64</u>
<u>65</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>65</u>	<u>65</u>	<u>65</u>
<u>66</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>66</u>	<u>66</u>	<u>66</u>
<u>67</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>67</u>	<u>67</u>	<u>67</u>
<u>68</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>68</u>	<u>68</u>	<u>68</u>
<u>69</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>69</u>	<u>69</u>	<u>69</u>
<u>70</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>70</u>	<u>70</u>	<u>70</u>
<u>71</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>71</u>	<u>71</u>	<u>71</u>
<u>72</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>72</u>	<u>72</u>	<u>72</u>
<u>73</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>73</u>	<u>73</u>	<u>73</u>
<u>74</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>74</u>	<u>74</u>	<u>74</u>
<u>75</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>75</u>	<u>75</u>	<u>75</u>
<u>76</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>76</u>	<u>76</u>	<u>76</u>
<u>77</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>77</u>	<u>77</u>	<u>77</u>
<u>78</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>78</u>	<u>78</u>	<u>78</u>
<u>79</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>79</u>	<u>79</u>	<u>79</u>
<u>80</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>80</u>	<u>80</u>	<u>80</u>
<u>81</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>81</u>	<u>81</u>	<u>81</u>
<u>82</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>82</u>	<u>82</u>	<u>82</u>
<u>83</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>83</u>	<u>83</u>	<u>83</u>
<u>84</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>84</u>	<u>84</u>	<u>84</u>
<u>85</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>85</u>	<u>85</u>	<u>85</u>
<u>86</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>86</u>	<u>86</u>	<u>86</u>
<u>87</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>87</u>	<u>87</u>	<u>87</u>
<u>88</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>88</u>	<u>88</u>	<u>88</u>
<u>89</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>89</u>	<u>89</u>	<u>89</u>
<u>90</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>90</u>	<u>90</u>	<u>90</u>
<u>91</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>91</u>	<u>91</u>	<u>91</u>
<u>92</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>92</u>	<u>92</u>	<u>92</u>
<u>93</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>93</u>	<u>93</u>	<u>93</u>
<u>94</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>94</u>	<u>94</u>	<u>94</u>
<u>95</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>95</u>	<u>95</u>	<u>95</u>
<u>96</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>96</u>	<u>96</u>	<u>96</u>
<u>97</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>97</u>	<u>97</u>	<u>97</u>
<u>98</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>98</u>	<u>98</u>	<u>98</u>
<u>99</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>99</u>	<u>99</u>	<u>99</u>
<u>100</u>	<u>Phycosphaera</u>	<u>100</u>	<u>100</u>	<u>100</u>

L.C.	P.C.	L.C.	.	.
.	L.C.	L.C.	.	.
P.C.	L.C.C.	L.C.	.	P.C.

CUADRO N° 12

CULTIVOS EMPLEADOS EN LOS EXAMENES DE LAS MUESTRAS
DE AGUA

CULTIVO	PROCEDENCIA
<u>Esch. coli</u> , cepa 36	Guelin (Inst. Pasteur - París)
<u>Esch. coli</u> , cepa 84	Direc. Principal Lab. O.S.N.
<u>Esch. coli</u> , tipo 026	Kauffman- Copenhage
<u>Esch. coli</u> , tipo 055	Kauffman- Copenhage
<u>Esch. coli</u> , tipo 0111	Kauffman- Copenhage
<u>Salmonella newport</u>	Direc. Principal Lab. O.S.N.
<u>Salmonella anatum</u>	Direc. Principal Lab. O.S.N.
<u>Salmonella paratyphi B</u>	Direc. Principal Lab. O.S.N.
<u>Salmonella paratyphi B</u>	Guelin (Inst. Pasteur- París)

Digamos que si bien el cultivo más polivalente es indudablemente el Esch. coli cepa 36 recibido de Guelin, éste no es lisado por fagos específicos para S. newport, Esch. coli, tipo 026 y para dos cultivos de Esch. coli aislados del país, las cepas 44 y 64.

De los cultivos seleccionados el Esch. coli cepa 84 lo fué como complemento del Esch. coli cepa 36 pues era sensible a los fagos que fallaban en lisar a esta.

Por otra parte se completó la serie de cultivos con algunos que demuestran especificidad frente a sus fagos, ellos fueron: S. newport; S. anatum; Esch. coli tipos O26: B 6, O55: B 5 y O,111: B 4.

Con todos estos cultivos se estudiaron muestras de agua del Río de la Plata, decantada, preclorada del Establecimiento Gral. San Martín a esta Capital y aguas de pozos semisurgentes. Con ello se pretendió tener una idea de la eficacia de la técnica y de los cultivos frente a muestras de contenido bacteriano, composición química y tratamiento variable.

Se discutirán a continuación los resultados obtenidos con cada uno de los tipos de agua examinados.

4) Examen de muestras de agua del Río de la Plata

En el cuadro N° 13 y en el gráfico N° 1 figuran los resultados obtenidos al estudiar en estas muestras el contenido en fago activo frente al Esch. coli cepa 36.

En ellos se han estudiado los resultados obtenidos en las distintas diluciones y además el N.M.P. de fago por 100 ml calculado en base a dichos resultados y a las porciones sembradas. Este valor es el único que necesita ser aclarado y lo será al comentar los resultados de la sensibilidad de la técnica.

En los gráficos se han representado los N.M.P. de fago al lado del N.M.P./100 de Esch. coli, tipo I.

Además se han representado los valores obtenidos de acuerdo a la notación de Guelin, quien establece para la presencia de fago en 10 cc de muestra la unidad en el gráfico.

11.000

4.300

22.000

31.000

31.000

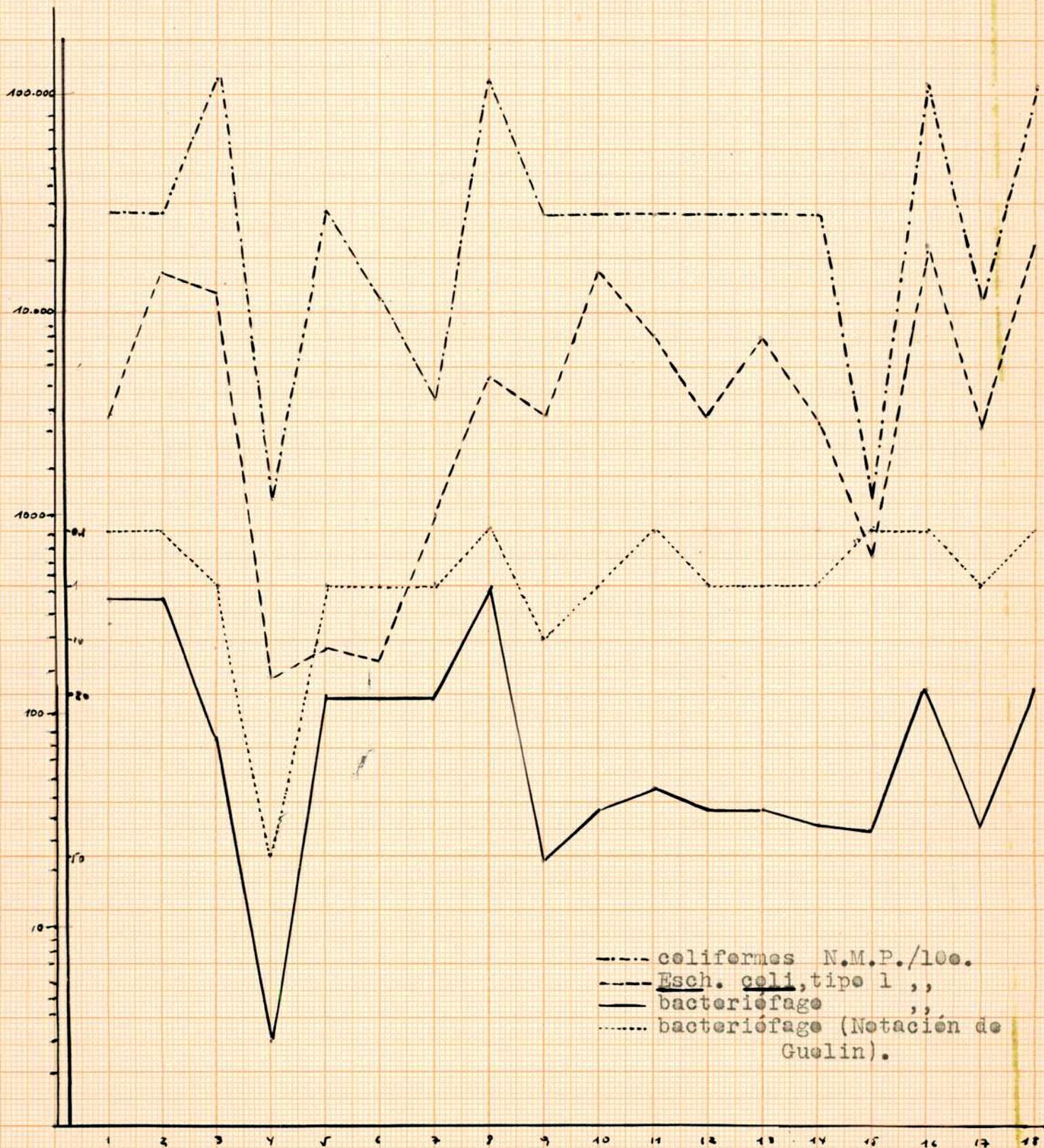
3/20/1960

N.P.F./100	NÚMERO DE UNIDADES POSITIVAS POR FILTRADO DE 100 ML. (1)						N.P.F./100
	50	10	1	0.1	0.01	0.001	
3.898	1	1	1	1	-	-	488
17.000	1	1	1	1	-	-	488
14.800	1		1	-	-	-	84
191.8	1	-	-	-	-	-	3
219	1	1	1	-	-	-	115
217	1	1	1	-	-	-	115
1.111	1	1	1	-	-	-	115
5.136	1	1	1	1	-	-	488
3.848	1	1	-	-	-	-	84
17.000	1	1	2	-	-	-	43
8.300	1	1	2	1	-	-	56
3.598	1	1	2	-	-	-	43
8.300	1	1	2	-	-	-	43
3.800	1	-	2	-	-	-	36
750	1	1	1	1	-	-	34
21.000	1	1	3	1	-	-	156
3.000	1	1	3	-	-	-	34
24.000	1	1	3	1	-	-	156

(1) A partir de la muestra N° 17, 1 cc; 0,1; 0,01 y 0,001 cc se sembraron por triplicado.

Gráfico N°1.

Variación de coliformes, Esch. coli tipo 1 y bacteriófago en agua del Río de la Plata.



En los cuadros N^o 14, 15, 16, 17, 18 y 19 figuran los resultados del estudio de la presencia de fagos específicos para distintas enterobacterias patógenas.

Por lo que respecta al contenido de fago activo frente al Esch. coli cepa 36 se puede concluir que la técnica estudiada es menos sensible que la oficial de O.S.H.

En efecto, en todos los casos, el bacteriófago fué identificado en diluciones menores que la que permitió evidenciar bacterias coliformes. Por lo que respecta a la relación Esch. coli tipo I y bacteriófago sólo en 4 muestras fué posible identificar a ambos hasta la misma dilución. Se trata de las muestras 5, 6, 8 y 15. Sin embargo, en ningún caso su presencia fué negativa cualquiera fuera el N.M.P./100 de bacterias coliformes totales o Esch. coli tipo I presentes. Esto indicaría que su búsqueda puede servir como índice de contaminación siempre que se considere para ello su ausencia o presencia. Si se desea un dato cuantitativo la técnica a elegir es la determinación de bacterias coliformes.

En los cuadros N^o 14 a 19 se puede observar que la presencia de fagos específicos para las distintas bacterias patógenas es muy irregular y no lleva a ninguna relación con el contenido de bacterias coliformes totales o Esch. coli tipo I. Este hecho estaría de acuerdo con datos que se tienen de la variación del contenido de distintas Salmonellas en el agua del Río de la Plata (31).

Suponemos que debe haber fagos en número grande y casi imposible de ensayar experimentalmente, de los cuales una buena parte han de estar presentes en agua de río y sobre todo del Río de la Plata.

RESULTADOS OBTENIDOS CON MUESTRAS DE AGUA DE CAJÓN DE LA PLATA

CUADRO N° 14

CUADRO N° 15

ENRIQUECIDAS CON Y AGUARDAS FRANTE A : ECOLI. COLI; CEPA 94					
Mues- tra N°	Número de tubos positivos para porciones sembra- das de ml:				N.M.P./100
	50	10	1	0.1	
4	1	1	-	-	24.4
10	1	1	-	-	24.4
11	-	1	-	-	17.0
12	1	1	-	-	24.4
13	1	1	-	-	24.4
14	1	1	1	-	12.2
16	1	1	-	-	24.4
17	1	1	-	-	24.4
18	1	1	-	-	24.4
19	1	1	-	-	24.4
20	1	1	-	-	24.4
22	1	1	-	-	24.4

ENRIQUECIDAS CON Y AGUARDAS FRANTE A: S. NEIPONT				
Mues- tra N°	Número de tubos positivos para porciones sembra- das de ml			N.M.P.
	50	10	1	
2	1	-	-	3.8
6	1	-	-	3.8
8	-	-	-	-
9	1	1	-	25
12	-	-	-	-
13	-	-	-	-
16	-	-	-	-
17	-	-	-	-
18	1	-	-	3.8
19	-	-	-	-
20	-	-	-	-
22	1	-	-	3.8

CUADRO Nº 16

ENRIQUECIDAS Y PROBADAS FRENTE A S. ANA I						
MUESTRA Nº	Número de tubos positivos para porciones sembradas de ml.					N.M.P./100
	50	10	1	0,1	0,01	
2	-	-	-	-	-	-
10	1	1	1	1	-	512
12	1	-	-	-	-	3,8
13	1	-	1	-	-	8,0
14	1	1	1	-	-	115
16	1	-	-	-	-	3,8
17	1	1	-	-	-	24
18	1	-	-	-	-	3,8
19	-	-	-	-	-	-
20	1	-	-	-	-	3,8
22	1	-	-	-	-	3,8

CUADRO Nº 17

ENRIQUECIDAS CON Y PROBADAS FRENTE A S. PARATYPHI B (CUELIN)						
MUESTRA Nº	Número de tubos positivos para porciones sembradas para ml.					N.M.P./100
	50	10	1	0,1	0,001	
2	-	-	-	-	-	-
7	1	1	1	1	-	512
12	-	-	-	-	-	-
13	1	-	-	-	-	3,8
16	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-
18	1	1	-	-	-	24
19	-	-	-	-	-	-
20	1	1	-	-	-	24
22	-	-	-	-	-	-

CUADRO Nº 18

ENRIQUECIDAS CON Y PRÓBADA FRENTE A ESCH. COLI TIPO 026					
Mues- tra Nº	Número de Tubos po- sitivos para porcio- nes sembradas de ml.				N.M.P./100
	50	10	1	0.1	
2	-	-	-	-	-
10	1	-	-	-	3,8
11	1	1	-	-	24,4
12	-	-	-	-	-
13	1	-	-	-	3,8
16	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-
18	1	1	-	-	24,4
19	-	-	-	-	-
20	1	-	-	-	3,8
22	-	-	-	-	-

CUADRO Nº 19

ENRIQUECIDAS CON Y PRÓBADA FRENTE A ESCH. COLI, TIPO 055					
Mues- tra Nº	Número de tubos po- sitivos para por- ciones sembradas de ml				
	50	10	1	0,1	
3	-	-	-	-	
10	-	-	-	-	
12	-	-	-	-	
13	-	1	-	-	
14	-	-	-	-	
16	-	-	-	-	
17	-	-	-	-	
18	-	1	-	-	
19	1	1	-	-	
20	1	-	-	-	
22	1	1	-	-	

Su acción sobre las bacterias específicas ensayadas parece ser nula si se tiene en cuenta el número escaso de resultados positivos obtenidos.

Debido a ello se concluye que sería interesante aportar más datos sobre este particular y ahondar la búsqueda sobre la especificidad de los cultivos. De los datos obtenidos la presencia o ausencia de bacteriófago específico para una de las enterobacterias patógenas estudiadas es dato valioso sobre la contaminación del agua por dicha bacteria, por lo menos en lo que se refiere a este tipo de agua.

5) Examen de muestras de agua decantada del Establecimiento Gral. San Martín.

Figuran los resultados obtenidos en el cuadro N° 20 y en el gráfico N° 2.

En este tipo de agua el número de bacterias coliformes totales es menor que el del agua del Río de la Plata. Además ha sufrido una coagulación con sulfato de aluminio que debe disminuir el número de partículas de fago así como disminuye el de bacterias. Debido a que es un agua tratada con un contenido regular de bacterias coliformes fué elegida para ensayar la técnica en estudio.

De los cuadros citados surge también una diferencia entre la investigación de fago y la investigación de bacterias coliformes. En 2 muestras se pudo identificar fago y Esch. coli tipo I en la misma dilución. Por otra parte es digno de comentario un resultado significativo. La muestra N° 12 con un N.M.P/100 de coliformes totales contenía fago hasta la porción de 10 ml lo que daba un N.M.P/100 ml de agua de 7,2. Este resultado así aislado carece desde luego de

CUADRO N° 20

RESULTADOS OBTENIDOS CON MUESTRAS DE AGUA DEBELENDA DEL ESTABLECIMIENTO GENERAL
SAN MARLIN (B.S.S.) PARA U.S.D.S. CON Y PROCLAS FORTI E AL. A.C.H. COLI CERA 36

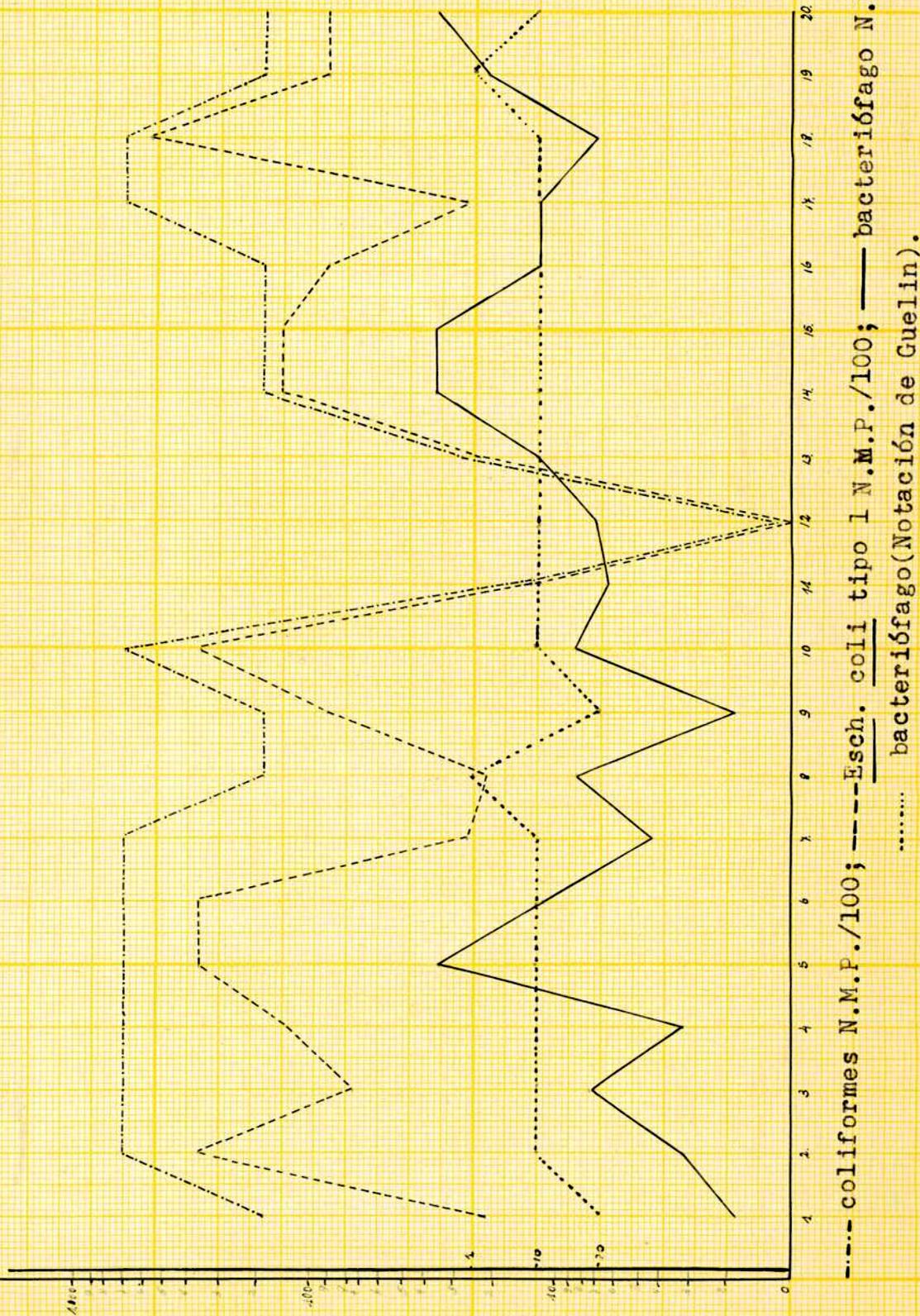
COLIFORMES TOTALES		ESCH. COLI TIPO I		BACTERIOLÓGICO	
Número de tubos positivos para porciones sembradas de ml	N.M.P./100	Número de tubos positivos para porciones sembradas de ml	N.M.F./100	Número de tubos positivos para porciones sembradas de ml	(1)

11	1	-	1	13	1	-	1	13	1	1	3	-	6.3
12	-	-	-	-	-	-	-	2	1	2	2	-	7.2
13	2	-	-	29	2	-	-	24	1	3	2	-	13.9
14	2	1	-	130	2	1	-	165	1	3	3	-	33.8
15	2	1	-	180	2	1	-	165	1	3	3	-	33.8
16	2	1	-	130	2	1	-	90	1	3	2	-	13.9
17	2	1	2	700	2	-	-	23.3	1	3	2	-	13.9
18	2	1	2	700	2	1	1	560	1	2	2	-	7.2
19	2	1	-	130	2	1	-	90	1	3	2	2	20.2
20	2	1	-	130	2	1	-	90	1	3	3	-	33.8

(1) 20 cc; 10 cc; 1 cc. y 0,1 cc se sembraron por triplicado

Gráfico N:2.

Variación de coliformes, Esch. coli tipo 1 y bacteriófago en agua decantada del Establecimiento Gral San Martin.



significación higiénica pero podemos asociarle a datos semejantes obtenidos con muestras de aguas semisurgentes donde la irregularidad en la concordancia de las técnicas comparadas se hizo aún más notoria.

Estos valores deben tenerse en cuenta pues aportan una esperanza de que se pueda aclarar la peligrosidad potencial en un agua aún en ausencia de bacterias coliformes.

La respuesta estará dada luego al acumular un número grande de datos y de su subsiguiente estudio estadístico. De los resultados comentados surge que para aguas de este tipo, si bien la técnica de investigación de fago es sensiblemente inferior a la investigación bacteriana en lo que a sensibilidad se refiere, no lleva de ninguna manera a resultados falsos. La presencia de valores de 1,8 a 34 por 100 ml de agua estuvo siempre asociada a un contenido bacteriano de significado higiénico, con excepción de una muestra en que estos no fueron demostrados y que ya ha sido comentada.

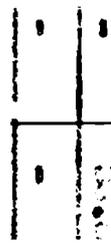
No existe relación entre los valores de fago y de bacterias coliformes, pero ésto deja de ser una objeción seria si se tiene en cuenta que se trataba en dos entes distintos y que no tiene porque variar en el mismo sentido.

Con un índice límite temporario de contenido fágico < 1 podemos, hasta aclarar debidamente este valor, considerar que un agua decantada con contenido mayor es deficiente.

6) Examen de muestras de aguas de pozos semisurgentes

Todos los ensayos se efectuaron enriqueciendo con el Bach. coli cepa 36. Los resultados figuran en el cuadro N° 21.

2 1 2 2 2



En él se han incluido, cuando fúe posible lograrlos los antecedentes de cada uno de los pozos examinados con el objeto de aclarar cualquier dato significativo que pudiera presentarse.

La contaminación bacteriana de las 50 muestras examinadas varió desde un N.M.P./100 de agua de < 2 hasta un valor indeterminado > 240.

De todas ellas en sólo 3 ocasiones se identificó fago. Una de las muestras contenía menor de 2 bacterias por 100 ml y era por consiguiente de acuerdo a las normas de O.S.N. un agua apta para el consumo, las dos restantes contenían 240 coliformes totales y eran deficientes.

La muestra menos contaminada tenía, según figura en el cuadro N° 21 antecedentes desfavorables. En un último examen bacteriológico había resultado apta, pero los anteriores registraban irregularidades de contaminación y de aptitud. El contenido en fago hasta la porción de 20 ml. puede ser significativa de una peligrosidad en potencia.

Los dos restantes con contaminación bacteriana elevada presentan en contraste con otros de igual contaminación, fago hasta las porciones de 10 y 1 ml respectivamente. El significado de éste contraste no lo sabemos, pero creemos interesante su aclaración en base a un número mayor de datos experimentales y su correlación epidemiológica.

A pesar de estos escasos datos positivos la aplicación de la técnica de investigación de fago en aguas semisurgentes no es recomendable debido al alto porcentaje bacteriológicamente inaptas en los cuales no se puede poner en evidencia partícula fágica alguna.

No quiere decir esto que éstas falten, puede muy bien tratarse de un defecto en la técnica de identificación. Para elucidar ésto se hizo un ensayo exploratorio.

Para ello en una muestra contaminada con 5 coliformes totales y 2,5 Esch. coli tipo I, se aisló de los tubos de caldo Mc Conkey que presentaban gas al cabo de 48 h de incubación a 37° C., en sendas placas de agar eosina azul de metileno. De cada una de ellas al cabo de 24 h. a 37° C. se procedió a aislar a agar inclinado 5 colonias representativas. Se tuvo así un total de 10 colonias aisladas. Dichos cultivos una vez incubados 24 hs. a 37° C. se emplearon en enriquecer las muestras de agua en cuestión.

Dicha muestra de agua había sido previamente mezclada con un volumen igual de agua de peptona (A II) e incubada a 37° C. durante 1 h y conservada en heladera a 4° C hasta el momento de su enriquecimiento.

Para ello se tomaron por triplicado porciones de 20 ml de la mezcla y se enriqueció cada serie con 0,1 ml de suspensión de las bacterias previamente aisladas.

Se tuvieron así 10 series de 3 porciones de 20 ml cada una. Se incubó 4 hs a 37° C y se procedió tal como se indicó en la técnica general probando siempre frente al cultivo empleado en el enriquecimiento.

CUADRO Nº 22

RESULTADOS OBTENIDOS AL PERIPECER Y PROBAR UNA
MUESTRA DE AGUA SEMISUCIAMENTE CON BACTERIAS CO-
LLIFORMES AISLADAS DE LA MISMA (*)

Cultivo Nº	Número de tubos positivos para porciones sembradas de 10 ml (**)
1	0
2	0
3	0
4	0
5	0
6	0
7	0
8	0
9	0
10	0

- (*) = coliformes totales: N.M.P./100 : 5
Esch. coli tipo I : N.M.P./100 : 2.5
- (**) = sembrado por triplicado
- o = ausencia de lisis en placa.

7) Ensayo de la sensibilidad de la técnica

Con este último resultado a la vista decidimos determinar cual era la sensibilidad de la técnica de investigación del bacteriófago. Si esta fuera pequeña, es decir, si se requiriera muchas partículas fágicas para obtener lisas visible se aclararían tal vez los datos irregulares obtenidos en pozos semisurgentes.

Para el estudio de la sensibilidad de la técnica se partió de una suspensión de fago de contenido conocido de partículas, dato que se obtuvo mediante la técnica b) del aislamiento y purificación de fagos específicos.

Se enriquecieron así por triplicado volúmenes de agua estéril conteniendo cantidades variables y crecientes de partículas de fago.

Se ensayaron tres fagos. Uno propagado sobre el Esch. coli cepa 36, otro específico para S. neonati y otro específico para Esch. coli tipo 055. Se enriquecieron con tres cultivos específicos e con el Esch. coli cepa 36 y los resultados obtenidos figuran en los cuadros N° 23, 24, 25 y 26.

De ellos surge que excepto para el fago propagado sobre el Esch. coli cepa 36, los restantes pueden identificarse aún en concentración tan reducida como una partícula.

CUADRO Nº 23

RESULTADO OBTENIDO AL ENRI. ULCER Y ENSAYAR FUENTE AL ESCH. COLI
CEPA 36 CANTIDADES VARIABLES DE PARTICULAS DE FAGOS
ESPECIFICO

Número de partículas agregadas	Resultados		
	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3
1	-	-	-
7	-	-	-
21	P.M.(6)	P.L.(13)	-
49	P.M.(2)	P.M.(2)	-
106	P.M.(5)	L.C.	P.M.(40)
1,000	L.S.C.	L.S.C.	L.S.C.
10,000	L.C.	L.C.	L.C.
70,000	L.C.	L.C.	L.C.
100,000	L.C.	L.C.	L.C.

CUADRO Nº 24

RESULTADO OBTENIDO AL ENRI. ULCER Y ENSAYAR FUENTE AL ESCH. COLI
CEPA 36 CANTIDADES VARIABLES DE PARTICULAS DE FAGOS ESPECIFICOS
PARA ESCH. COLI TIPO 055

Número de partículas agregadas	Resultados		
	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3
1	L.C.	L.C.	L.C.
10	L.C.	L.C.	L.C.
20	L.C.	L.C.	L.C.
40	L.C.	L.C.	L.C.
100	L.C.	L.C.	L.C.
170	L.C.	L.C.	L.C.

CUADRO Nº 25

RESULTADOS OBTENIDOS AL ENRIQUECER Y ENSAYAR FRENTE A ESCH. A
S. MONROE. MUESTRAS CONTIENDO CANTIDADES VARIAS
DE PARTICULAS DE SU TIPO ESPECIFICO

Número de partículas agregadas	Resultados		
	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3
3	L.C.	L.C.	L.C.
9	L.C.	L.C.	L.C.
15	L.C.	L.C.	L.C.
21	L.C.	L.C.	L.C.
45	L.C.	L.C.	L.C.
90	L.C.	L.C.	L.C.

CUADRO Nº 26

RESULTADOS OBTENIDOS AL ENRIQUECER Y ENSAYAR FRENTE A ESCH.
COLI TIPO 055 MUESTRAS CONTIENDO CANTIDADES VARIAS
DE PARTICULAS DE SU TIPO ESPECIFICO

Número de partículas agregadas	Resultados		
	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3
1	L.C.	L.C.	L.C.
10	L.C.	L.C.	L.C.
20	L.C.	L.C.	L.C.
40	L.C.	L.C.	L.C.
100	L.C.	L.C.	L.C.
170	L.C.	L.C.	L.C.

CAPITULO

C O N C L U S I O N E S

- 1) Es indistinto practicar las diluciones de las muestras con agua de peptona diluida o con agua corriente estéril. Se adoptó para la realización del trabajo ésta última.
El enriquecimiento durante 4 hs a 37° C es suficiente para obtener la mayor sensibilidad de la técnica. Esta no aumenta con un enriquecimiento de 24 h a la misma temperatura, obteniéndose en cambio resultados de lectura confusa debido a sobrecultivos de bacterias esporuladas.
Es posible eliminar la flora bacteriana luego del enriquecimiento, por calentamiento durante 30 minutos entre 58° y 60° C sin afectar la viabilidad del fago.

- 2) Una concentración de cristal violeta de 40 mgr. por litro de agua de peptona concentrada (A VIII) es suficiente para inhibir hasta $1,2 \times 10^8$ enterococos no afectando el desarrollo de igual cantidad de Esch. coli cepa 36.
El fago capaz de lisar al Esch. coli cepa 36 es sensible al cristal violeta hasta una concentración de 10 mgr/lt.
Por otra parte aguas contaminadas artificialmente con hasta 2.400 enterococos por ml no presentaron resultados confusos. Debido a que esta contaminación es muy raramente alcanzada en un agua, no se siguió estudiando la eliminación de dichos microorganismos.

- 3) De los cultivos estudiados el Esch. coli cepa 36 es el más polivalente en lo que a capacidad de ser lisado por fagos heterólogos

se refiere.

El Esch. coli cepa 36 no es lisado por fagos específicos para S. newport, Esch. coli tipo 065 : B S y Esch. coli cepas 44 y 64 bacterias estas últimas aisladas en el país.

Para el estudio de las muestras de agua se seleccionaron los siguientes cultivos: Esch. coli cepa 36 y 64 ésta última la más prevalente de las aisladas en el país y además sensible a los fagos no capaces de lisar a la primera.

Esch. coli tipos 026, 065, 0111, Salmonella newport, S. anatum y S. paratyphi B todas ellas con el objeto de identificar fagos específicos y deducir así el posible contacto del agua con el cultivo correspondiente.

- 4) Del examen comparado de la contaminación por bacterias coliformes y por el bacteriófago de muestras de agua del Río de la Plata se puede concluir que la segunda técnica es menos sensible. Sin embargo a nuestro juicio la búsqueda del bacteriófago puede servir como índice de contaminación en éste tipo de agua siempre que se consideren los datos cualitativamente. En caso de requerirse una apreciación cuantitativa la técnica a elegirse es la determinación bacteriana. De los datos obtenidos se concluye que la presencia o ausencia de fago específico para alguna de las bacterias empleadas es dato bastante significativo sobre la contaminación del agua por dicha bacteria. Sin embargo se cree interesante aportar más datos sobre el particular.

- 5) Del estudio de 20 muestras de agua decantada del Establecimiento Gral. San Martín se concluye que la determinación bacteriana de la contaminación en éste tipo de agua es más sensible que la determinación de la misma por el bacteriófago.
- Aún con el resultado significativo de la presencia de fago en ausencia de coliformes en una muestra se concluye que también debe otorgársele importancia cualitativa a la presencia de bacteriófago, ya que siempre estuvo presente cualquiera fuera el contenido de bacterias coliformes del agua.
- Se requiere mayor número de datos y su correspondiente estudio epidemiológico para considerar con mayor seriedad las muestras de contenido positivo de fago en ausencia de coliformes.
- 6) En el examen de 50 muestras de agua proveniente de pozos semisurgentes se acentuó más la irregularidad de los resultados obtenidos. Se mantiene la mayor sensibilidad de la técnica bacteriana que permite determinar contaminación tan pequeña como 2,2 bacterias coliformes totales por 100 ml en ausencia de bacteriófago en los volúmenes sembrados.
- Por otra parte de acuerdo a los resultados obtenidos la ausencia de fago no es defecto del cultivo empleado en su determinación. Hasta tener un mayor número de datos se concluye que la técnica de determinación de la contaminación de aguas provenientes de pozos semisurgentes por el bacteriófago no es recomendable.
- 7) Se justifica la expresión N.M.P. de fago por 100 ml de muestra ya que mediante la técnica empleada es posible identificar en un volumen enriquecido, hasta una partícula.

CAPITULO VI

R E S U M E N

Se ha estudiado la presencia de bacteriófago como índice de contaminación de aguas.

Se establecieron primeramente las condiciones de trabajo: diluyente a usar, tiempo de enriquecimiento y temperatura de inactivación de las bacterias.

Debido a la presencia natural de enterococos en algunas muestras de agua del Río de la Plata, se estudió la posibilidad de su inhibición o eliminación durante el enriquecimiento de las muestras.

Se estudió la especificidad de diversos cultivos pertenecientes a la familia de las Enterobacteriaceae, frente a distintas preparaciones de fagos específicos para algunos de los mismos cultivos ensayados.

Se estudiaron muestras de aguas provenientes del Río de la Plata, decantada del Establecimiento Gral. San Martín y de pozos semi-surgentes. El estudio se hizo determinando comparativamente la contaminación por su contenido en bacteriófago capas de lisar al Esch. coli cepa 36 y otras bacterias seleccionadas y mediante la aplicación de la técnica oficial de O.S.M.

Se estudió la sensibilidad de la técnica determinándose el número mínimo de partículas de fagos que era posible poner en evidencia.

A P E N D I C E

A) MEDIOS DE CULTIVO LIQUIDOS

I) Caldo extracto de carne (10 veces concentrado)

Extracto de carne	30 gr.
Peptona (Bacto)	50 gr.
Agua destilada	1000ml.

Se calentó hasta disolución. Se ajustó el pH entre 6,4 y 7,0. Se calentó a ebullición durante 10 min. Se filtró y repartió en Erlenmeyer en porciones de 100 ml, se esterilizó en autoclave a 120° C. durante 20 minutos.

II) Agua de peptona.

Peptona (Bacto)	10 gr.
Cloruro de sodio	5 gr.
Agua destilada	1000 ml.

Se calentó hasta disolución de los componentes. Se ajustó el pH entre 7,0 y 7,2. Se entubó en porciones de 9 ml y se esterilizó en autoclave a 120° C durante 20 minutos.

III) Caldo extracto de carne.

Extracto de carne	3 gr.
Peptona (Bacto)	5 gr.
Agua destilada	1000 ml.

IV) Caldo lactosado

Extracto de carne	3 gr.
Peptona (Bacto)	3 gr.
Agua destilada	1000 ml.

Se calentó hasta disolución de los componentes. Se ajustó el pH a 6,9. Se llevó a ebullición; se dejó enfriar a 25° C., se le agregó 0,5% de lactosa. Se distribuye en tubos de ensayo provisto de tubitos de Durham. Se esterilizó en autoclave a 120° C. durante 25 minutos.

V) Agua de triptona

Bacto-triptona	10 gr.
Agua destilada	1000 ml.

Se calentó hasta disolución. Se entubó en porciones de 3 ml y se esterilizó en autoclave a 120° C durante 20 minutos.

VI) Agua de peptona - glucosa- fosfato.

Peptona (Bacto)	5 gr.
Fosfato potásico (K_2HPO_4)	3 gr.
Agua destilada	1000 ml.

Se calentó suavemente hasta disolución. Se ajustó el pH a 7,5 y se agregaron 5 gr de glucosa, se entubó en porciones de 3 ml y se esterilizó en autoclave a 115° C. durante 10 minutos cuidando de que los tubos no estuvieran en contacto con el agua del autoclave.

VII) Medio citrato de Koser.

Cloruro de sodio	5 gr.
Sulfato de magnesio	0.2 gr.
Fosfato monocálcico ($\text{NH}_4 \cdot \text{H}_2\text{PO}_4$)	1 gr.
Fosfato dipotásico (K_2HPO_4)	1 gr.
Agua destilada	1000 ml.

Se disolvieron los componentes agitando. Se agregó entonces 2 gr. de ácido cítrico y se llevó a pH 6,8; se entubó en porciones de 3 ml y se esterilizó en autoclave a 120° C. durante 10 minutos.

VIII) Caldo Mc Conkey

Taurocolato de sodio comercial	5 gr.
Lactosa	10 gr.
Peptona (Bacto)	20 gr.
Cloruro de sodio	5 gr.
Agua destilada	1000 ml.

Se calentó la marmita durante 2 horas y luego se dejó en heladera durante una noche. Se filtró y se ajustó al pH a 7,4. Se distribuyó en tubos de ensayo, provistos de tubitos de Durham, a razón de 5 ml por tubo. Finalmente se esterilizó en autoclave a 115° C durante 30 minutos.

IX) Caldo Mc Conkey (doble)

Taurocolato de sodio comercial	10 gr.
Lactosa	20 gr.
Peptona	40 gr.

Cloruro de sodio	10 gr.
Agua destilada	1000 ml.

Se procede en la misma forma que para la preparación del caldo McConkey simple. Se distribuyó en tubos de ensayo provisto de tubitos de fermentación de Durham a razón de 10 ml por tubo.

B) MEDIOS DE CULTIVO SOLIDOS

I) Agar extracto de carne.

Extracto de carne	3 gr.
Peptona (Bacto)	5 gr.
Cloruro de sodio	7,5 gr.
Agar	20 gr.
Agua destilada	1000 ml.

Se disolvió el extracto de carne y la peptona en agua destilada. Se agregó el agar previamente lavado una noche en corriente de agua. Se calentó hasta disolución, se ajustó el pH a 7,4, se filtró, envasó las porciones de 100 ml y esterilizó en autoclave a 120° C. durante 20 minutos.

II) Gelatina nutritiva.

Extracto de carne	3 gr.
Peptona (Bacto)	5 gr.

en caliente y una vez frío a unos 30° C. se controló el pH y se lo ajustó a 7,2. Se repartió en tubos en porciones de 3 ml y se esterilizó en autoclave a 110° C. durante 15 minutos. Una vez esterilizado se enfrió rápidamente para detener cualquier hidrólisis.

C) REACTIVOS

I) Kovacs

Para-dimetil-amino benzaldehido	5 gr.
Alcohol etílico	75 ml.
Acido clorhídrico concentrado	25 ml.

II) Rojo de metilo

Rojo de metilo	0,1 gr.
Alcohol etílico	300 ml.
Agua destilada	completar a 500 ml.

III) Voges-Proskauer

a) Hidróxido de potasio	100 gr.
Agua destilada	1000 ml
b) -naftol	60 gr.
Alcohol etílico	1000 ml.

BIBLIOGRAFIA

- 1) - LEIGUANDA R.H. - Comunicación personal
- 2) - GUELIN A.- "La survie du bacille typhique Vi et de son bactériophage dans l'eau". Ann. Inst. Pasteur - 78, 78, 1950
- 3) - FERRANOLA R. - Examen bacteriológico de aguas - 1947 El Ateneo, Bs. As.
- 4) - MALLMATH W.L. - "A new yardstick for measuring sewage pollution". Sewage works J. - 12, 875, 1940.
- 5) - GOETZ A.; GILMAN R.H., RAWN A.M.- "Application of molecular filter membranes to specific problems in water analyses". J. Am. Water Works Assoc. 44, 471, 1952.
- 6) - GUELIN A.- "Recherches sur les bactériophages de l'eau de la Marne", Ann. Inst. Pasteur, 69, 219, 1943.
- 7) - GUELIN A.- "Etude des bactériophages typhiques Vi dans les eaux", Ann. Inst. Pasteur 75, 484, 1948
- 8) - GUELIN A.- "Sur le choix des souches étalons pour la détection du bacille typhiques dans les eaux par la recherche des bactériophages spécifiques", Ann. Inst. Pasteur, 79, 188, 1950.
- 9) - GUELIN A.- "Sur la présence du bactériophage parfringens dans les eaux et son rôle dans l'épuration des eaux stagnantes", Ann. Inst. Pasteur, 79, 447, 1950.
- 10) - ADAMS M.A., Ed. - Methods in Medical Research, vol. 2, 1950.
- 11) - LIOFF A.- "lysogeny" - Bact. Rev. , 17, 269, 1953
- 12) - BRADLEY P.L. y BOYD J.S.K.- "Readsorption of phage produced in cultures of lysogenic strains of Salmonella typhi-aurius", J. Path. Bact. Vol. LIIV N° 4 p. 891, 1952
- 13) - HANKIN E.H.- "L'action bactéricide des eaux de la Jumna et du Ganger sur le vibron du cholera", Ann. Inst. Pasteur, 10, 511, 1896.
- 14) - THORNTON F.H. - The Lancet, p. 1841, 1916.

- 15) - D'HERELLE F. - Le bactériophage et son comportement. 1926, Masson, Paris
- 16) - LEPIERRE P., NICOLLE P. y GIUNTINI J. " Sur la détermination de la taille des bactériophages par l'ultracentrifugation" Ann. Inst. Pasteur, 68, 503, 1942.
- 17) - LURIA S.E., ANDERSON T.F.- "The identification and characterization of bactériophages with the electron microscope". Proc. Nat. Acad. Sci., 28, 127, 1942.
- 18) - ANDERSON T.F.- "The reaction of bacterial viruses with their host cells". Botanical Rev. vol. 15 N° 7 pág. 464. 1949
- 19) - GUELLIN A. - " Action des rayons lumineux sur le bactériophage " , Ann. Inst. Pasteur, 68, 245, 1942.
- 20) - FORK T., GARRIN A., CLINE J.- "The mechanism of virus attachment to host cell 1) The role of ions in the primary reaction", J. Exp. Med. 93, 1951.
- 21) - ANDERSON T.S.- "The inheritance of requirements for adsorption cofactors in the bacterial virus T 4", J. Bact. 55, 651, 1948.
- 22) - DELBERCK M.- "Bacterial viruses or bactériophages" Biol. Rev. 21, 30-40, 1946
- 23) - ANDERSON T.- "The reaction of bacterial viruses with their host cells" Botanical Rev. vol. 15 N° 7 p. 464, 1949
- 24) - RIVERS T. Ed.- Viral and Rickettsial infections of man p. 155, 1948
- 25) - ADAMS M. A. Ed.- Methods in Medical Research, vol. 2, 1950.
- 26) - BARRIT M.W.- The identification of the Voges-Proskauer reaction by the addition of alphanafitol, J. Path. Bact. 42, 441, 1936
- 27) - GUELLIN A. " Etude quantitative du bactériophage de la mer", Ann. Inst. Pasteur, 74, 104, 1948.

- 28) - Métodos para el examen de las aguas y de los líquidos cloacales.
O.S.N. B. S. Ag.
- 29) - HOSKINS S.K.- "Most probable numbers for evaluation of coli-aerogenes test by fermentation tube method"
Public Health Report, 49, 1934.
- 30) - LEIGUARDA R.H., PESO O.A., KEMPNEY J.C.- "La azida sódica y el telurito de potasio en la investigación de enterococos". Rev. de Obras Sanitarias de la Nación, N^o 121 pág. 123, 1947.
- 31) - PESO O.A., LEIGUARDA R.H., KEMPNEY J.C.- "Identificación de bacterias patógenas intestinales en el agua del Río de la Plata". Rev. de Obras Sanitarias de la Nación N^o 131, p.101, 1949.

Antonio J. Kempney
Leiguarda R.H.

I N D I C E

INTRODUCCION

ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

BACTERIOFAGO

PARTE EXPERIMENTAL

- A) Aislamiento y purificación de fagos específicos**
- B) Selección de cultivos de *Esch. coli***
- C) Reacciones bioquímicas**
- D) Técnica empleada en el estudio de la especificidad de los cultivos**
- E) Técnica general empleada en el estudio de muestras de agua**
- F) Determinación de bacterias coliformes totales y de *Esch. coli* tipo I en las distintas muestras de agua estudiadas**

RESULTADOS EXPERIMENTALES Y DISCUSION

- 1) Examen de las condiciones de trabajo**
- 2) Experiencias conducentes a eliminar la interferencia de los enterococos**
- 3) Ensayo de la polivalencia de los distintos cultivos ensayados**
- 4) Examen de muestras de agua del Río de la Plata**
- 5) Examen de muestras de agua decantada del Establecimiento Cral. San Martín**

- 6) Examen de muestras de aguas de pozos semi-surgentes
- 7) Ensayo de la sensibilidad de la técnica

Conclusiones

Resumen

Apéndice

Bibliografía