

# UN MÈTODE NOU DE RECOMPTE DE BACTERIÒFAGS\*

Comunicació presentada el dia 11 de novembre de 1965 pel doctor

**JORDI PINYOL i NOLLA**

Metge bacteriòleg del «Servei d'estudis de la contaminació per l'abocament de les aigües residuals» al Laboratori Municipal de Barcelona

\* Aquest treball ha estat dut a terme al Departament de Bacteriologia del Laboratori Municipal de Barcelona, que gentilmente ha prestat a l'autor el suport necessari.

En els nostres estudis sobre aigües residuals i aigües del mar contaminades ens hem trobat contínuament en la necessitat d'haver d'emprar mètodes que ens indiquin no solament si una mostra d'aigua està o no contaminada, sinó que ens expressin també la densitat de la contaminació, o sigui la quantitat. En els estudis comparatius entre unes mostres i altres parlem de graus o d'índex de pol·lució bacteriana.

En la recerca de bacteriòfags en l'aigua de mar també ens hem trobat que necessitàvem parlar un idioma quantitatiu.

L'aplicació dels mètodes de recompte de bacteriòfags actualment en ús i coneguts per nosaltres no ens permetia de presentar uns resultats quantitatius suficientment satisfactoris.

Tots els mètodes pateixen d'un error de principi. En no poder reconèixer els bacteriòfags d'una manera directa, sigui morfològicament, per tinció o per reaccions bioquímiques, ens hem de valer de procediments indirectes, com ho és la determinació de llur poder de lisi vers un germen determinat. Però ni tots els bacteriòfags no lisen una sola espècie, ni disposem d'un germen sensible a tots els bacteriòfags de grup.

Es parteix, per definició, utilitzant un germen que és lisi en la major quantitat possible de bacteriòfags del grup, però mai no disposem d'un que sigui sensible a tots ells. I encara, de vegades, aquests gèrmens es lisen a bacteriòfags afins, com s'esdevé entre certs coli i algunes shigelles.

Això demostra que qualsevol mètode quantitatiu no podrà ésser mai exacte, almenys en els nostres coneixements actuals.

Però justament perquè hem de partir d'antuvi amb aquestes limitacions, creiem que no ens podem permetre de sumar els errors inicials de principi als d'uns mètodes inapropiats, sigui a causa de llur poca sensibilitat o perquè les xifres trobades s'expressin en nombre empíric i poc indicatiu.

El nostre mètode, basat, com tots els altres, en una determinació indirecta dels bacteriòfags, previ enriquiment, i la lectura transformada en xifres del sistema mètric decimal que ens dóna el càlcul de probabilitats, creiem que ha reeixit a resoldre aquesta llacuna.

El mètode en si no constitueix cap descoberta teòrica; no descrivim res que sigui absolutament original. Simplement se'ns va ocórrer per associació d'idees com a cosa lògica, que ens permetia de desenvolupar-lo amb

el poc material de què disposem al laboratori, i que ens donava uns resultats fàcilment reproduïbles.

En realitat no és sinó l'adaptació al recompte de bacteriòfags del conegut mètode del «MPN» (Most Probable Number), amb el qual els autors americans expressen els índexs de contaminació de bacteries coliformes en les mostres d'aigua contaminada per gèrmens d'origen fecal.

En no tenir coneixement que aquesta tècnica hagi estat publicada ni posada en ús amb anterioritat a nosaltres, hem volgut exposar-la a la consideració de la SOCIETAT CATALANA DE BIOLOGIA proposant que els resultats amb ella obtinguts puguin servir de base per a una expressió quantitativa del grau de contaminació de bacteriòfags d'una aigua contaminada, és a dir: un índex de contaminació.

#### TÈCNICA

1. Homogeneïtzació de la mostra d'aigua per agitació amb perles de vidre o electroagitador.
2. En una sèrie de tubs d'assaig numerats es colloquen 9 ml de solució salina fisiològica en cada un d'ells.
3. Es procedeix a obtenir dilucions progressives 1/10 de la mostra en els tubs anteriors pel mètode habitual (1 ml de la mostra en el tub núm. 1; agitar; traspasar 1 ml d'aquest tub al núm. 2, etc.).
4. En gradeta a part es disposen sèries de 3-5 tubs d'assaig que contenen aigua de peptona al 2 %, numerant cada sèrie.
5. La gradeta, la inicien dues sèries de 3-5 tubs marcats A i B.  
Els tubs «A» contenen 10 ml d'aigua de peptona al 6 %.  
Els tubs «B» contenen 2 ml d'aigua de peptona al 6 %.
6. A cada sèrie es posa:
  - «A»: 10 ml de mostra d'aigua.
  - «B»: 1 ml de mostra d'aigua.
    - 1: 1 ml de la solució del tub 1 (aigua sol. fisiol.)
    - 2: 1 ml de la solució del tub 2
    - 3: 1 ml de la solució del tub 3
 i així successivament.
7. Cada tub de cada una de les sèries se sembra abundantment (5 ml els tubs «A», i 1 ml cada tub de les sèries restants) d'un cultiu jove de 18 hores del germen sensible que utilitzem com a detector dels bacteriòfags.
8. La gradeta, la portem a l'estufa a 37° C per un període de 4 hores.
9. Transcorregut aquest temps, la passem a bany maria a 56° C, on es mantindrà 30 minuts (amb aquest pas pretenem de tuir les formes

- vegetatives bacterianes que han crescut procedents de la mostra d'aigua contaminada i que serien un destorb en el procés ulterior).
10. Mentrestant hom haurà preparat una placa gran de gelosa nutritiva, sembrada en superfície per a un cultiu jove del germen sensible.
  11. Un cop la gradeta ha estat treta del bany maria, i refredats els tubs, s'agafa de cadascun d'ells una porció d'una nansa de platí i s'inocula delicadament i ordenadament la superfície de la placa sembrada.
  12. La placa és portada a l'estufa a  $37^{\circ}$  C per 8 hores, i seguidament es procedeix a la lectura de les zones de lisi total.
  13. Es consulten les taules de probabilitats que ens donaran el nombre més probable de bacteriòfags per 1 ml, per 100 ml o per 1 litre, segons la forma d'expressar-ho.

### DISCUSSIÓ

*Dr. CAÑADELL*

Quin germen jove se sembra en la recerca de bacteriòfags?

*Dr. PINYOL*

El germen corresponent més sensible de la col·lecció. Si hom recerca bacteriòfag coli serà un Coli. Si bacteriòfag tífic, un Eberth sensible.