

## Oligodinamia por la plata

### ESTUDIO DE ALGUNAS VARIABLES

Por OSVALDO M. REPETTO y FERNANDO MODERN

---

En el estado actual del conocimiento que se tiene acerca de la acción oligodinámica de la plata, ésta constituye un hecho suficientemente comprobado por diversos investigadores en varios países, incluyendo entre ellos al nuestro, gracias a los trabajos de Sordelli, Wernicke, Modern, de la Barrera y Dortzenbach. Aunque su mecanismo, nos es desconocido, ha quedado establecido que el efecto es debido a la presencia de dicho metal disuelto al estado iónico.

La mayoría de los trabajos publicados fueron llevados a cabo, utilizando la plata al estado metálico sea en forma de láminas, hilos, barras, sea depositándola sobre diversos soportes (paredes del recipiente, lana de vidrio y bujías de material cerámico) o bien disolviéndola por la acción de una corriente eléctrica. Como estos métodos, a excepción del último, incorporan al medio cantidades de plata desconocidas, cuya determinación se ve grandemente dificultada por su pequeñez y teniendo en cuenta que el efecto bactericida es debido a sus iones, en nuestras experiencias la fuente de plata fué una solución valorada de su nitrato, solución que luego encontramos fué utilizada ya por Gibbard en sus experiencias comparativas entre esa fuente y anillos plateados, obteniendo dicho autor resultados análogos.

La acción oligodinámica, depende de diversas variables, conociéndose algunas de carácter físico, como el tiempo y la temperatura, con las cuales varía en el mismo sentido, otras de carácter químico, para las cuales se desconoce si el fenómeno es puramente tal o bien fisicoquímico; entre estas últimas probablemente caigan las influencias debidas al número de gérmenes.

En nuestras experiencias las dos primeras variables, fueron fijadas (el tiempo en una hora y la temperatura en la ambiente, esto es próxima a 20°). En estas condiciones fué estudiado el efecto de las otras variables mencionadas.

## PARTE EXPERIMENTAL

Empleamos en nuestros ensayos la *Eseherichia Coli*, partiendo del cultivo sobre agar estría, del cual sembrábamos en caldo, utilizando el mismo a las 24 horas de incubado a 37°. Este cultivo posee un número de gérmenes aproximadamente constante del orden de los 4 mil millones por  $\text{cm}^3$ . La suspensión obtenida se diluía sucesivamente en el momento de usarla hasta alcanzar unos 4000 gérmenes por  $\text{cm}^3$ ; agregándose de esta solución 1  $\text{cm}^3$  a tubos de ensayos que ya contenían 9  $\text{cm}^3$  de solución de plata y otras sustancias. El número final de gérmenes es entonces de 400 por  $\text{cm}^3$ .

Los tubos eran agitados convenientemente, dejándolos estar durante una hora con agitación ocasional, al cabo de la cual, se determinaba el número de gérmenes por siembra en caja de Petri. Se empleó siempre un testigo con gérmenes sin plata.

Se comenzó por buscar la concentración mínima de iones plata, que impide totalmente el desarrollo de los gérmenes, en agua destilada y en la cantidad mencionada, en las condiciones fijadas anteriormente.

Los resultados encontrados en varios ensayos y en días distintos, se resumen a continuación:

Conc. en Ag.	N/10 mil	N/100 mil	N/millón	N/10 M.	N/100 M.	0 (testigo)
% de gérmenes desarrollados con respecto al testigo .....	0	0	0	25 %	75 %	200 g.
	0	0	0	100 »	100 »	600 »
	0	0	0	45 »	90 »	160 »
	—	0	0	10 »	—	480 g

Todas las experiencias coinciden en la inhibición total del desarrollo cuando la concentración alcanza a ser N/millón en iones plata; cuando se hace 10 veces menor presenta una acción manifiesta a excepción del ensayo hecho con 600 gérmenes por  $\text{cm}^3$ , ya que desarrollan el 100 % de los gérmenes colocados; probablemente a más del error del método, haga sentir su efecto el número de gérmenes. Podemos sacar de aquí, aún operando dentro de un cierto margen en el número de gérmenes, que hasta unos 600 por  $\text{cm}^3$ , actúa en forma total la concentración citada.

Partiendo del dato encontrado, pasamos a estudiar la influencia de diversas sustancias sobre la acción oligodinámica. Para ello la concentración final en iones Ag a excepción del testigo fué siempre

normal millonésima; se empleó además otro testigo únicamente con gérmenes y plata.

A pesar de que se utilizó como indicador de la acción oligodinámica la *Escherichia Coli* especie que ofrece resistencia a la auto-depuración cuando se le suspende en agua desprovista de sales, esa resistencia no es grande, ya que se encontró disminución al realizar el recuento por dilución y siembra, inmediatamente de hacer la dilución y a la hora. Para obtener valores comparables, el recuento se hizo por dilución y siembra de la suspensión a la hora. Desgraciadamente los valores que hemos encontrado no pueden considerarse sino aproximados, ya que coincidimos con Schioppa, en la imposibilidad de mantenerse en el manejo de las masas de gérmenes en valores constantes; dicho autor encuentra también reducción notable del número de gérmenes en las aguas desprovistas de sustancias orgánicas llegando en algunos casos a la hora hasta el 60 %.

Para observar directamente el efecto del agua destilada sobre los gérmenes, se cultivó una cepa móvil de los mismos, éstos dejaban ver una pérdida casi total de la movilidad, después de ser lavados con agua destilada, centrifugados y suspendidos nuevamente en agua destilada. El hecho de haberse obtenido valores mayores en el recuento por turbidimetría que por dilución y siembra, comprueba la observación anterior.

Tratando de eliminar el fenómeno mencionado, en el caso supuesto de ser aditivo con respecto a la acción oligodinámica, el testigo para los gérmenes se mantuvo en las mismas condiciones de temperatura y tiempo. Los resultados obtenidos se resumen a continuación:

Sales minerales ( $\text{ClNa}$ ,  $\text{Cl}_2\text{Ca}$ ) el efecto inhibitor se hace visible recién cuando su concentración alcanza a ser N/100.

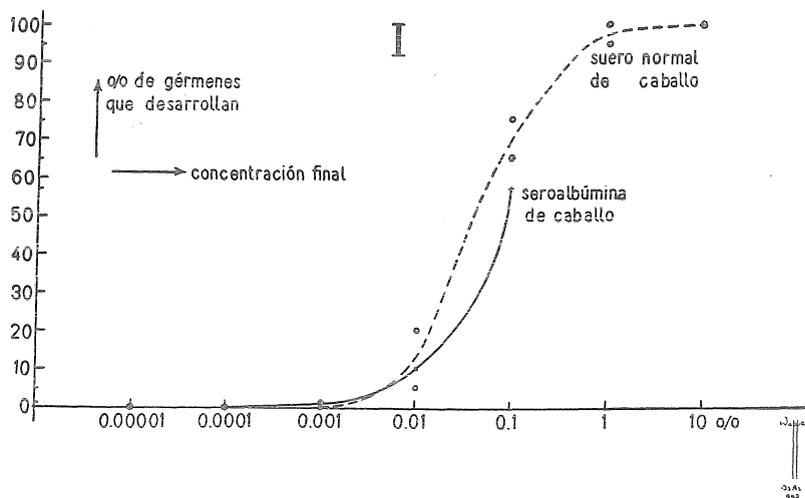
Aminoácidos (glicocola) el efecto inhibitor es poco apreciable.

Hidratos de carbono (glucosa, almidón) si bien el efecto inhibitor es débil, cuando se alcanza para el almidón una concentración del 2,5 % aquél se hace neto, aunque no pasa de la tercera parte del número original de gérmenes desarrollados.

Colorantes: El efecto inhibitor es poco notable, empleándose los mismos en concentraciones finales que no ejercen influencia directa apreciable sobre los gérmenes (1 en 10.000). No se observan diferencias de importancia entre los dispersos molecularmente en agua (rojo cresol, rojo fenol) y los coloidales (rojo congo, congo rubí).

*Suero normal de caballo.* — La acción inhibidora es neta, aumentando con la concentración del mismo en el medio. Es visible cuando alcanza a 1 en 10 mil, observándose la inhibición total de la acción oligodinámica, cuando llega a 1 en 100.

Este comportamiento se observa mejor en el gráfico (I), donde se expresan en abscisas la concentración final del suero y en ordenadas el porcentaje de gérmenes que desarrollan.



Como puede verse, a partir de la concentración de 0,01 en que se pone en evidencia la inhibición, la curva asciende rápidamente. Estos resultados están de acuerdo con los encontrados últimamente por Gibbard (1937), ya que en una publicación anterior del mismo autor (1933), los resultados son opuestos: Pilod y Codville (1932) lo afirman para la peptona, albúmina de huevo, suero sanguíneo, en la acción oligodinámica por el cobre y Leitner (1930) para la plata. Por otra parte, Lausch (1938), propone el reemplazo del fenol por plata en ciertas condiciones para la protección de los sueros.

El efecto inhibidor por el material rico en proteínas, ha sido comprobado por uno de nosotros, en ocasión de probar la eficacia en el lavado de carnes, mediante agua activada por electrólisis entre electrodos de plata. Si bien se observó una disminución muy grande del número de gérmenes presentes, el proceso era incapaz de darle una protección apreciable a las carnes así lavadas. Indudablemente la fijación de la plata por las proteínas impide su acción ulterior.

Como el suero constituye un material complejo, para estudiar la acción se recurrió a una proteína pura, la sueroalbúmina de caballo cristalizada, de la cual se hizo una solución al 1 % esterilizándola luego por filtración.

Los resultados encontrados se resumen a continuación:

Concentración en albúmina	Concentración en plata	Gérmenes des.	% des.
0,1 %	N/millón	590	57
0,01 »	»	100	10
0,001 »	»	10	1
0,0001 »	»	0	0
0,00001 »	»	0	0
0	»	0	0
0	0	1.030	100

El comportamiento es análogo al del suero, ya que si bien éste parece ser más activo a igualdad de concentración proteica, debemos tener en cuenta que el número de gérmenes para la sueroalbúmina es muy superior al empleado para el estudio con el suero normal de caballo, que fué de unos 200 por  $\text{cm}^3$ .

Si suponemos que el efecto inhibitor de la albúmina sea debido a la fijación de los iones Ag por combinación química, unión que estará a cargo de la fracción proteica ionizada negativamente, dicho efecto será mayor cuanto más alta sea la concentración de los iones Prot.<sup>-</sup> presentes en el medio.

El aumento de [Prot.<sup>-</sup>] lo podemos lograr a temperatura constante, aumentando el pH, por exigirle así la relación que rige el equilibrio de disociación ácida:

$$\frac{[\text{Prot.}^-] [\text{H}^+]}{[\text{Proteína}]} = k$$

En efecto al disminuir  $[\text{H}^+]$  aumenta  $[\text{Prot.}^-]$  y disminuye  $[\text{Proteína}]$  o sea el equilibrio se desplaza de izquierda a derecha



la concentración de iones Prot.<sup>-</sup> irá en aumento y por lo tanto la capacidad de combinación con los iones Ag.

Sacamos de aquí que a medida que se ascienda en la escala de pH el efecto inhibitor será mayor.

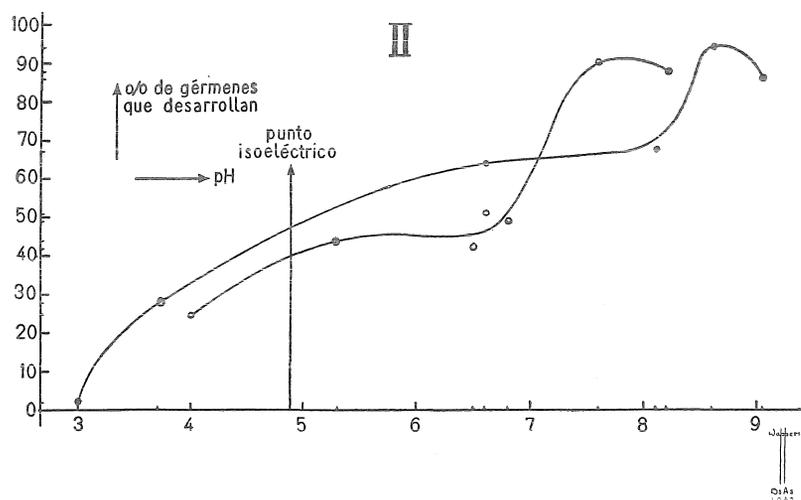
Para verificar estas conclusiones se empleó la concentración final de 0,1 % en albúmina, que es la que produjo en el ensayo preli-

minar una inhibición del 50 %, adecuada para nuestros fines. Se adicionó cantidades diversas de ácido y base y solución de Ag hasta que su concentración era N/millón. Los resultados encontrados se resumen a continuación:

pH	Albúm.	Ag.	% desar.	pH	Albúm.	Ag.	% desar.
2,7	0,1 %	N/millón	0	4,0	0,1 %	N/millón	25
3,0	»	»	2	5,3	»	»	44
3,7	»	»	23	6,5	»	»	42
6,6	»	»	64	6,6	»	»	51
8,1	»	»	67	6,8	»	»	49
8,6	»	»	94	7,6	»	»	90
9,05	»	»	86	8,2	»	»	88
7,6	0	»	0	7,5	0	»	0
7,6	0	0	100	7,5	0	0	100

Los dos últimos tubos corresponden a los testigos, esto es sin albúmina y con plata y sin albúmina ni plata.

Representando gráficamente estos resultados dan curvas que ascienden con el pH, presentando algunas variaciones atribuibles a errores del método (II).



Los mismos confirman las consideraciones anteriores, aunque probablemente el fenómeno sea más complejo; aparece el efecto inhibitorio como debido a la eliminación de los iones Ag por combinación de la proteína disociada en su fracción ácida, aumentando por lo tanto con el pH.

Para descartar esas diferencias como causadas únicamente por la acidez del medio, se llevaron a cabo diversas experiencias de desarro-

llo en función del pH, no obteniéndose un pH óptimo del mismo sino una zona de mayor desarrollo que va de pH 6,2 a 7,4. Los diversos pH se lograron empleando mezclas buffer de fosfatos mono y disódicos M/15; 2 cm<sup>3</sup> en total para 20 cm<sup>3</sup> de medio.

*Influencia del número de gérmenes.* — Otra variable en la acción oligodinámica de la plata, es el número de gérmenes presentes. Schioppa (1933) en sus experiencias, encuentra que ella no ejerce influencia. Si se tiene en cuenta, que dicho autor utilizó probetas plateadas, es decir una fuente de plata no limitada, sus resultados no pueden compararse con los nuestros ya que la fuente de plata en nuestros ensayos fué siempre limitada.

Se empleó el método siguiente:

Partiendo del cultivo de Coli en agar estría, se sembró en 10 cm<sup>3</sup> de caldo, incubado 24 horas a 37°; pasando nuevamente a igual volumen de caldo como antes pero 18 horas, al cabo de las cuales se siembran 3 cm<sup>3</sup> de cultivo obtenido para cada 200 cm<sup>3</sup> de caldo previamente llevado a la temperatura de incubación, empleándose el cultivo a las 6 horas. Se centrifuga rápidamente, lava el residuo dos veces con agua destilada estéril empleando cada vez ¼ del volumen primitivo del cultivo, centrifugando y suspendiendo en 50 cm<sup>3</sup> de agua destilada estéril.

En tubos de centrifuga se colocan 9 cm<sup>3</sup> de la suspensión obtenida agregando 1 cm<sup>3</sup> de las soluciones de plata de diversas concentraciones o sea que éstas quedarán diluídas al décimo. Durante este agregado se agitan los tubos para evitar acumulaciones locales de plata. Se deja estar una hora, con agitación ocasional, sembrándose entonces en cajas de Petri.

Se centrifugaban los tubos, reservándose el líquido sobrenadante para ensayar sus propiedades oligodinámicas.

El recuento de la suspensión original se hacía por dilución y siembra en cajas: para operar en condiciones semejantes este recuento se hacía a la hora de obtenida la suspensión.

Los resultados se resumen a continuación:

Nº de gérmenes por cm <sup>3</sup>	Ag N/100	Ag. N/1.000	Ag. N/10.000	Ag. N/100.000
100.000.000	0	0	0	opalescente
120.000.000	0	0	0	>
2.000.000.000	0	0	8.000	>
3.000.000.000	0	0	incontables	>

Se observa, que con el aumento del número de gérmenes, aumenta también la concentración de Ag necesaria para impedir to-

talmente el desarrollo de los mismos; esto es, debe alcanzar a la concentración de N/1.000 a N/10.000.

Sin embargo el líquido sobrenadante, permite una dilución en algunos casos alta sin perder sus propiedades oligodinámicas. Parecería como si al aumentar el número de gérmenes presentes, fuera necesario para impedir el desarrollo en su totalidad, una cierta concentración en iones Ag en el medio sin que dicha cantidad sea fijada por los mismos. Así en ensayos llevados a cabo con una concentración insuficiente de plata, que permite un cierto desarrollo, en los sobrenadantes se observa acción oligodinámica neta.

Agradecemos al Dr. Sosa sus oportunas indicaciones.

#### RESUMEN Y CONCLUSIONES

1) Se estudió la influencia de diversos factores en la acción oligodinámica de la plata, utilizando como indicador de la misma la *Escherichia Coli*.

2) El suero normal de caballo y la albúmina cristalizada de la misma especie, ejercen un efecto inhibitor neto, sobre la acción oligodinámica. Para la albúmina, se encontró que dicho efecto aumenta con el pH, manteniendo constantes todas las otras variables.

3) La concentración de iones Ag, necesaria para impedir totalmente el desarrollo depende del número, de gérmenes. De N/1.000.000 para unos 600 gérmenes llega a N/1.000 para 3 millones, dejando actuar una hora.

#### BIBLIOGRAFIA

- BURHMANN (1933), *Z. fur Hygiene*, **115**, 241.  
BRUNI (1938), *Ann. d'Hygiene*, **48**, 733.  
GIBBARD (1933), *Am. J. Pub. Health*, **23**, 910.  
GIBBARD (1937), *Am. J. Pub. Health*, **27**, 112.  
LAUSCH (1938), *Z. fur Hygiene*, **120**, 350.  
LEITNER (1930), *Biochem. Z.*, **221**, 42.  
PILOD y CODVILLE (1932), *Annales d'Hygiene*, **10**, 654.  
SCHIOPPA (1933), *Ann. d'Hygiene*, **43**, 571.  
SCHIOPPA (1934), *Ann. d'Hygiene*, **44**, 894.  
UGLOW y GAU (1935), *Z. fur Hygiene*, **117**, 488.  
WERNICKE y MODERN (1928), *Anales Asoc. Quím. Arg.*, **16**, 158.  
WERNICKE y SORDELLI (1921), *Anales Asoc. Quím. Arg.*, **9**, 145.  
WERNICKE y DORTZENBACH (1927), *Anales Asoc. Quím. Arg.*, **15**, 138.  
WERNICKE, DORTZENBACH y DE LA BARRERA (1926), *Rev. Soc. Arg. Biol.*, 2 julio.