

## II. — ATENUACION DE LOS HONGOS PATÓGENOS Y DE LOS FERMENTOS

Merced á ciertas influencias nocivas de intensidad determinada y de poca extension se consigue cambiar ciertas bacterias de tal manera que cesan de producir ciertos fenómenos vitales durante un tiempo más ó ménos largo, aún cuando los cultivos sucesivos se hagan en condiciones normales. En estos casos, las causas activas son ménos importantes que las que producen la muerte de las bacterias. Por otra parte, los efectos que ocasionan son más considerables que los producidos por los agentes que suspenden el desarrollo de las bacterias; en efecto, éstos solo obran durante el tiempo que están en el substrato nutritivo. Pero, á veces, puede verificarse por la influencia más duradera de un agente más débil. Para producir una atenuacion duradera convienen temperaturas elevadas, lo mismo que diferentes venenos químicos, cuando se emplean como se debe.

En cuanto permiten asegurarlo las observaciones hechas hasta el día, las propiedades vitales influidas de esta manera son la facultad fermentatriz y el poder patógeno de las bacterias. En cuanto á las demás funciones y á los productos de nutricion (pigmentos, fermentos, etc.) no se ha observado aún análoga disminucion. La pérdida de las dos propiedades antedichas se ha designado, de un modo general, con el nombre de *atenuacion de las bacterias*. En cuanto á saber si por la atenuacion hay al mismo tiempo un debilitamiento de la nutricion y de la multiplicacion que permita explicar la victoria de las células del organismo, ó si sólo hay una funcion vital importante para la lucha contra las células (produccion de una sustancia tóxica, etc.) que se extinga ó interrumpa por la influencia nociva, esto sólo podrán demostrarlo ulteriores investigaciones.

Los mohos no han presentado hasta ahora ninguna atenuacion (Fränkel, véase más arriba).

Respecto á las bacterias de la fermentacion capaces de atenuarse, podemos citar las observaciones de Fitz. El *bacillus butyricus* anaerobio ha podido modificarse con una temperatura de 90° sostenida durante dos horas, ó con una de 84° sostenida durante siete horas, hasta el punto de que, por multiplicacion activa en materiales adecuados, no da los ordinarios productos de fermentacion. De la misma manera, el agente de la fermentacion butírica, aislado ulteriormente por Fitz, y el *bacillus Fitzianus* pierden sus propiedades activas, pero las recuperan de ordinario con facilidad.

Han logrado atenuarse hasta hoy: el *bacillus anthracis*, el bacilo del carbunco sintomático, el bacilo del cólera de las gallinas, el bacilo del mal rojo del cerdo y el agente aún desconocido de la rabia.

La atenuacion del bacilo carbuncoso es la mejor estudiada. Como medios muy aptos para producir esta accion es preciso citar, sobre todo, los altos grados de temperatura. Las temperaturas activas varían entre 42 y 55°. Deben obrar tanto más tiempo cuanto más bajas sean. Así, segun Toussaint, una temperatura de 55° atenúa ya los bacilos carbuncosos al cabo de diez minutos; segun Chauveau, bastaría hacer obrar durante quince minutos una temperatura de 52°; la de 50° durante veinte minutos, y la de 47° durante una á cuatro horas, si ántes se sostuvo la temperatura por espacio de veinte horas á 42-43°. Segun Pasteur y Koch, para obtener la desaparicion completa de la accion patógena sería preciso mantener los bacilos á 43° durante seis días, y á unos 42° durante veintiocho á treinta días.

Segun los datos de Pasteur y de Koch, para atenuar los bacilos se procede del modo siguiente: se hacen los cultivos en caldo de gallina esterilizado en capas bastante tenues dentro de frascos de Erlenmeyer; estos frascos se ponen en una estufa de Arsonval, regulada para unos 42°. Pero, por rigurosa que haya sido la regulacion de este aparato, se observan con facilidad temperaturas variables en el interior. De aquí resulta que puede ser algo diferente la atenuacion de los gérmenes contenidos en los diversos frascos.

Además, á veces pueden formarse esporos, que por lo general ya no se producen á los 42°, pero que cuando existen hacen imposible la atenuacion de los cultivos. Esto permite explicar los fracasos obtenidos con algunos cultivos. A partir del octavo día, es necesario tomar diariamente muestras y determinar su grado de atenuacion, ora teniendo el microbio en caldo esterilizado y mantenido á 37°, de modo que los esporos se formen con rapidez, ora inoculando un ratón por medio de una muestra del cultivo y preparando con el bazo del animal cultivos en los cuales se dejan fructificar los gérmenes. Los cultivos ó los esporos así obtenidos conservan durante muchísimo tiempo la virulencia de la muestra que les ha dado origen. Despues de sostenerlos diez días á 42°, los bacilos están ya tan atenuados que los conejos y las cobayas soportan casi sin riesgo la inoculacion. Con un lapso de tiempo algo más corto, es verdad que mueren las cobayas, pero resisten los conejos. Del décimo al vigésimocuarto día se obtiene lo que se llama el «carbunco de los ratones», porque mata á estos animales solamente.

Segun Koch, estos bacilos muy atenuados se conducen de un modo diferente que los bacilos virulentos, cuando se introducen en el organismo. Los capilares pulmonares se llenan de pseudo-filamentos en extremo grandes, y de un modo tal que nunca se observa nada análogo con el bacilo ordinario del carbunco.

La primera y la segunda vacuna, empleadas por Pasteur para la

inoculación preventiva de los carneros, se obtienen por el método descrito, al cabo de doce ó veinticuatro días.

Segun Pasteur, el oxígeno tiene, sobre todo, una gran influencia en este procedimiento de atenuación. Koch ve en la acción de la temperatura el factor esencial, que puede ser favorecido por el efecto de ciertos productos de la nutrición de los bacilos. Los resultados obtenidos á diferentes temperaturas elevadas, manifiestan del modo más evidente que el efecto está subordinado casi exclusivamente á ellas y que, sin disputa, lo mismo es función del grado de calor que de la duración de éste.

Se ha examinado el asunto de saber si trasportando los bacilos atenuados á cultivos normales sucesivos recobran su virulencia, ó si conservan indefinidamente la que han adquirido. Las investigaciones sobre este particular no están de acuerdo, y son todavía demasiado pocas numerosas para permitir determinar actualmente cuáles son los casos en que la virulencia vuelve y cuáles son aquellos en que se pierde indefinidamente. La virulencia parece reaparecer con más rapidez cuando se ha obtenido la atenuación por el procedimiento de Toussaint, es decir, al cabo de un tiempo muy corto y con temperaturas elevadas. Los bacilos atenuados por una temperatura de 55°, sostenida diez minutos, recuperan su virulencia en los primeros cultivos hechos en las condiciones normales (Chauveau); lo mismo sucede con los bacilos atenuados á 47°. Por otra parte, con el procedimiento de Pasteur (temperatura de 42-43°) no se observa retorno alguno á la virulencia. Así Koch ha podido cultivar durante dos años en las más favorables condiciones un cultivo atenuado por una estancia de veintinueve minutos en la estufa á 42°, sin que los últimos cultivos tuvieran el poder de infectar á un ratón. Los caracteres morfológicos de los bacilos, igual que el aspecto de los cultivos, eran absolutamente lo mismo que los de los bacilos virulentos. Segun Pasteur, se vuelve á recobrar la virulencia inoculando, por medio de los bacilos atenuados, primero á una cobaya recién nacida; ésta sucumbe á la infección, y entonces se inocula por medio de su sangre á una cobaya de un día, luego una de dos días y así sucesivamente se llega á aumentar la virulencia hasta que mueren los mismos animales adultos. Koch no ha podido en este caso observar ningún retorno á la virulencia.

Entre los demás medios capaces de producir una atenuación de los bacilos carbuncosos, merecen mencionarse las sustancias químicas tóxicas para las bacterias. Primero las empleó Toussaint, luego Chamberland y Roux. Segun estos últimos, el ácido fénico obra en la proporción de 1/600 atenuando en veinticuatro horas un cultivo sostenido á 35°; al cabo de doce días se advierte todavía cierta virulencia. El bicromato potásico mata los bacilos cuando se halla en solución al 1/1700. Si es

ménos concentrada (1/200-1/500) sólo produce una atenuación tal del cultivo que éste ya no es capaz de matar á los carneros, al paso que aún sucumben los conejos y cobayas. Si se deja obrar una solución de ácido sulfúrico al 2 por 100 durante ocho ó diez días y á una temperatura de 35° sobre los esporos del carbunco, cultivando éstos en gelatina normal, dan cultivos que matan á las cobayas, pero no á los conejos.

Buchner ha podido observar una atenuación de la virulencia de los bacilos del carbunco en los cultivos sucesivos en ciertos substratos nutritivos (solución de extracto de carne, con ó sin peptonas) cuando empleaba simultáneamente un agitador de modo que penetrase mucho aire en el líquido nutritivo. La primera descripción de los procedimientos de atenuación empleados por Buchner ha sido objeto de diversas críticas; sin embargo, las inoculaciones preventivas practicadas por Franck por medio de bacilos atenuados con este método, parecen probar que con él puede obtenerse realmente una atenuación gradual. También parece que se atenúan los bacilos manteniéndolos durante mucho tiempo en un mismo líquido de cultivo (Koch).

En fin, segun Arloing, exponiendo los cultivos durante tres horas á una luz viva, se provoca una atenuación de la bacteria carbuncosa. Segun Chauveau y Wossnessenski, produce el mismo efecto un fuerte aumento de presión.

Las bacterias patógenas que han manifestado una actitud análoga á la de las anteriores, son: el bacilo del cólera de las gallinas, el bacilo del carbunco sintomático y el del mal rojo del cerdo. Respecto del primero, aún no se ha establecido el procedimiento de atenuación; para el bacilo del carbunco sintomático es preciso emplear, de preferencia, altas temperaturas. Un procedimiento nuevo y muy particular de atenuación es el practicado por Pasteur para el mal rojo. En efecto, ha visto que la virulencia del germen específico de esta afección aumentaba por el paso sucesivo del bacilo por el cuerpo de los pichones; por el contrario, se disminuía con el paso sucesivo por el cuerpo de los conejos (véase más arriba).

Un método nuevo, cuyo valor no está fundado todavía por completo, es el que usa Pasteur para atenuar el virus rábico. Hé aquí sucintamente la marcha seguida en este caso por el sabio francés. Siendo todavía desconocido por completo el agente de la rabia y no habiendo sido cultivado nunca, era preciso, ante todo, para las investigaciones sobre la atenuación, producir un virus rábico puro y de intensidad casi fija. Obtiénese este último transmitiendo la enfermedad de conejo á conejo. Si primero se inocula un conejo bajo la dura-madre por medio de los materiales procedentes de un perro rabioso, se declara la rabia después de un período de incubación de unos catorce días; pasando por una serie de estos animales, el virus rábico aumenta de intensidad

y el período de incubación disminuye; á las cincuenta inoculaciones consecutivas ya no es más que de siete días. De la 50.<sup>a</sup> á la 90.<sup>a</sup> no cambia ya nada. El virus se aclimata en el conejo y tiene una intensidad fija. La médula de estos conejos contiene virus en toda su extensión.

Cuando se divide la médula en fragmentos de algunos centímetros y se suspenden éstos en un aire seco, la virulencia desaparece con lentitud. El tiempo necesario para la desecación completa varía con el tamaño de los fragmentos y, ante todo, con la temperatura exterior: cuanto más baja es la temperatura más persiste la virulencia. Si se conservan los fragmentos al abrigo del aire ó en una atmósfera de anhídrido carbónico, la virulencia se conserva durante meses, suponiendo se consiga alejar los gérmenes saprofitos. Para obtener virus rábicos atenuados capaces de utilizarse para las inoculaciones preventivas, se pone simultáneamente una serie de fragmentos de médula en cierto número de frascos cuyo aire se haya desecado por la potasa. Los fragmentos desecados durante uno ó dos días, como los materiales frescos, producen la rabia al cabo de siete días; en los de seis días la incubación dura dos semanas; á los siete días de permanencia en el aire seco la médula no ejerce acción alguna en los conejos.

Actualmente no es posible dar explicaciones positivas acerca del agente activo, ni comprender su acción. Sobre este asunto, Pasteur no ha formulado más que hipótesis, que demuestran cómo por medio de especulaciones vagas y audaces puede este sabio de genio obtener importantes resultados experimentales.

### III.— MEDIOS PARA MATAR LAS BACTERIAS

Los medios aptos para destruir los hongos inferiores tienen especial interés, porque en la desinfección práctica se trata de obrar sobre el agente infeccioso de tal manera que ya no se desarrolla éste ni aún en las más favorables condiciones.

En primer lugar, sobreviene la muerte cuando hay agotamiento de la materia nutritiva ó falta un alimento esencial, y si el estado de vida latente que de aquí resulta persiste durante mucho tiempo. A la suspensión del desarrollo sucede al fin la muerte de los individuos; sólo que el tiempo necesario para el aumento del efecto producido varía aún según la resistencia específica de las bacterias.

Las formas que más resisten son los esporos, los cuales soportan el estado de vida latente durante diez y hasta cien años. Los más sensibles son los bacilos aspóreos, los micrococcos, y sobre todo los numerosos hongos parásitos.

La falta de agua representa un papel muy considerable. También en la naturaleza representa un papel la desecación, como un medio

destructor de las bacterias. Merced á ella perecen, al cabo de un tiempo relativamente corto, las bacterias que no forman esporos. El tiempo durante el cual resisten á la desecación las bacterias aspóreas y los esporos nos da un criterio muy útil para determinar si una forma dudosa debe ó no considerarse como una forma duradera. Los espirilos y algunas especies de micrococcos (*streptococcus*) parecen sensibles en particular á la desecación. Verosímilmente presentarán ciertas diferencias las formas duraderas correspondientes á las diversas especies, pero aún no se sabe nada fijo sobre este particular.

Cuando son anormales las demás condiciones biológicas de las bacterias, no producen efectos tan señalados. La presión y la electricidad no parecen obrar mortíferamente sobre los microbios, sino cuando son en extremo intensas. La luz fuerte del sol debe de tener una influencia bastante enérgica; sin embargo, es preciso repetir las investigaciones sobre este punto, teniendo en cuenta ciertos factores nocivos que pueden existir al mismo tiempo.

Un medio muy poderoso para matar los hongos inferiores consiste en el empleo de temperaturas elevadas. Las temperaturas extremadamente bajas dificultan siempre el desarrollo de las bacterias, pero no las matan. La acción del calor es función del grado de temperatura y de su duración. Con ayuda de temperaturas relativamente bajas y que obren durante largo tiempo, puede obtenerse el mismo efecto que con una alta temperatura que dure poco. Aparte de esto, las temperaturas necesarias para producir la muerte de las bacterias varían mucho, conforme á las especies. También se observa aquí que existe la mayor diferencia entre las bacterias esporígenas y las bacterias aspóreas. Estas últimas, en general, mueren cuando están húmedas ó en líquidos, por temperaturas de 48 á 60°, mantenidas durante dos horas. En el estado seco, los microbios resisten por lo general durante más tiempo. Aun los bacilos esporígenos pueden matarse con temperaturas relativamente bajas, cuando se repite la calefacción y durante los intervalos se cuida de que las condiciones sean tales que se desarrollen los esporos de modo que den bacilos. Cuando el calor mata á éstos, antes de que haya nueva formación de esporos, se puede estar seguro de que después de calentar cinco á seis veces no existen ya esporos germinativos y que todos los esquizomicetos hanse aniquilado. El suero, por ejemplo, puede desembarazarse de todos los microbios que contiene, calentándolo á 56° una hora diaria. Ya es mucho más difícil matar con certidumbre los esporos de los mohos; no basta para anonadarlos ni aún una atmósfera calentada á 120°, que obre durante media hora; sólo llegan á destruirse por completo cuando se sostiene la temperatura durante siete horas y media á 110 y 115°. Los esporos del *penicillium* se han manifestado menos resistentes que los del *aspergillus niger*. Los