

CAPÍTULO OCTAVO

MÉTODO PARA LA INVESTIGACION DE LAS BACTERIAS

No entra en el plan de esta obra el hacer una exposicion completa de los métodos particulares de investigaciones bacteriológicas; esto pasaría de los límites asignados á ella, y podemos dispensarnos tanto mejor de hacerlo, cuanto que podemos remitir á la descripción detallada de los métodos hecha por Hueppe (3^a edición) (1) y al trabajo que acaba de aparecer sobre el mismo asunto de Haber y Becker (Leipzig. Vogel, 1886).

En las páginas que siguen sólo se darán los métodos más importantes para la investigación microscópica de las bacterias, para su cultivo y para su demostracion en el agua, en el aire y en el suelo.

I. — ESTUDIO MICROSCÓPICO DE LOS HONGOS INFERIORES

Pueden tenerse que examinar al microscopio los más diferentes objetos, líquidos, sustancias sólidas, alimentos, polvo, tierra, organismos vegetales ó animales, colonias de hongos, etc. Ante todo, debe tenerse en cuenta el hecho de que absolutamente en todo cuanto nos rodea se encuentran hongos inferiores y que, para demostrar la presencia de éstos en uno ú otro de los objetos en cuestion, es preciso evitar que los

(1) Acaba de publicarse por la casa Steinheil, de París, una edicion francesa del *Tratado de Hueppe*, por el Dr. Van Ermengen.

gérmenes del medio ambiente no penetren en la preparacion. Por consiguiente, los instrumentos, los vasos, los líquidos, etc., deben estar exentos de hongos, lo cual puede obtenerse, con los primeros sobre todo, calentándolos por lo ménos á 150°, ó poniéndolos en una solucion de sublimado al 1/2000. Si hay que hacer investigaciones sobre los hongos patógenos, es preciso tener en cuenta el hecho de que en la superficie del organismo vivo y sano pululan un sinnúmero de hongos. Se encuentran gérmenes en cantidad innumerable en la piel y en la cavidad bucal. Despues de la muerte propáganse éstos con suma rapidez y, lo primero, en todas las partes que están en relacion con la superficie. Las muestras con que deben hacerse las investigaciones de los hongos patógenos no pueden tomarse nunca, por consiguiente, en la superficie no limpia; y despues de la muerte es necesario poner todo lo posible al descubierto la cara interna de los órganos, practicando las secciones con cuchillos calentados.

La observacion microscópica directa (en todo caso, despues de añadir una solucion clorurado-sódica al $\frac{1}{2}$ por 100, una mezcla de glicerina y agua ó una solucion de potasa al 1/10) sin otros medios, no permite llegar al fin sino para los hongos mayores y á lo sumo en los cultivos de esquizomicetos; al paso que estos últimos, aun con los más grandes aumentos no pueden observarse sino cuando en la preparacion se se hallan otros objetos (células, núcleos, restos de núcleos y masas cristalinas ó amorfas). Por consiguiente, en casi todos estos casos es menester colorear los micro-organismos. Éstos absorben ciertos principios colorantes con una energía extraordinaria y la mayor parte de las veces se logra obtener que sólo se coloren los micro-organismos, ó por lo ménos con más intensidad, al paso que los otros elementos de la preparacion se modifican muy poco ó nada absolutamente. Aun allí donde se debe comprobar la ausencia de esquizomicetos, no puede formarse juicio con certidumbre sino con la ayuda de los métodos de coloracion.

El tratamiento de las preparaciones es diferente, segun se trate de examinar líquidos ú órganos sólidos.

Los líquidos se desecan primero en tenues capas sobre cubre-objetos, llevando á uno de éstos, con ayuda de un hilo de platino encorvado, una pequeña cantidad y ensanchándola en él por movimientos circulares; ó, para alcanzar aún mejor el fin propuesto, colocando otro cubre-objetos sobre el primero, de suerte que la gotita se aplaste por la presion y la capa de liquido se extienda hasta la periferia de los cubre-objetos. Sepáranse ambos cristales uno de otro y se obtienen así dos superficies bañadas por una tenue capa líquida que se deseca. Si entónces se quisiera poner el cubre-objetos en contacto con la solucion colorante, la capa se desprendería de nuevo y desaparecería.

Para evitar este inconveniente es preciso, lo primero, fijar la capa en el cubre-objetos. Esto se logra colocando las preparaciones durante bastante largo tiempo en alcohol absoluto, ó bien calentándolas algunos minutos á 110-130° (dos á diez minutos). (El grado justo de calefaccion es algo diferente para los diversos objetos y debe establecerse despues de algunos tanteos.) Puede calentarse de una manera suficiente y muy cómoda pasando los cubre-objetos dos ó tres veces por la llama de un mechero Bunsen ó de una lámpara de alcohol. El movimiento se verifica poco más ó ménos con la rapidez con que se corta el pan. Despues de esta pequeña operacion, los microbios se adhieren con tanta fuerza al cristal que pueden conservarse sin riesgo mucho tiempo en los líquidos acuosos. En los cubre-objetos preparados de esta manera, viértese entónces gota á gota la solucion colorante; casi siempre hay que dejar que la solucion obre durante quince á veinte minutos. Si se necesita prolongar más la accion, es útil dejar que floten los cubre-objetos en un platillo que contenga la solucion colorante. Se desaloja entónces el exceso de esta última en la preparacion tomando el cubre-objetos por medio de una pinza y poniéndolo en papel de filtro. Se lava con agua destilada y, á veces, con ácido acético diluido (5 á 10 gramos por 100 c. c. de agua); despues se trasporta la preparacion con el agua al porta-objetos, ó se deseca y se engasta en esencia de clavo y bálsamo del Janadá.

Los órganos deben endurecerse primero varios días en alcohol; para ello basta que estén sumergidos en él y partidos en pequeños fragmentos. Luégo, por medio del microtomo, se practica una serie de cortes lo más tenues posible y se ponen en alcohol absoluto ó en la solucion colorante. En esta última permanecen los cortes de media á cinco horas, y en casos especiales hasta veinticuatro horas. Este tiempo puede disminuirse considerablemente si se eleva la temperatura (30 á 40°). Cuando se sacan los cortes de la solucion, todo el tejido se encuentra coloreado con mucha intensidad; se trata entónces de hacer que aparezcan las bacterias, poniéndolas en alcohol ó en el ácido acético diluido, los cuales extraen de las células la materia colorante y sólo dejan coloreados los microbios, ó á lo sumo los nucleolos. En la mayoría de los casos se obtiene de preferencia la decoloracion del tejido poniendo los cortes en alcohol, dejándolos permanecer en él quince á treinta minutos y trasportándolos en seguida á la esencia de clavo. Á veces es bueno emplear ántes del alcohol ácido acético diluido. Los cortes pueden estudiarse directamente en la esencia de clavo, ó bien se ponen en el porta-objetos, se quita con cuidado la esencia y se los engasta en el bálsamo.

Algunas materias colorantes no se conservan en la esencia de clavo; en este caso se emplea la esencia de bergamota ó el xilol. Si se dis-

pone de un microtomo de congelacion se ponen primero los cortes en una solucion de cloruro sódico, luégo con precaucion en el alcohol absoluto y se tratan como arriba queda dicho.

Como sustancias colorantes se emplean rara vez el carmin ó la hematoxilina; con mucha más frecuencia los colores de anilina, por los cuales tienen mayor afinidad los microbios. Se distinguen, con Ehrlich (1), dos grandes grupos de anilinas que se caracterizan claramente por sus propiedades químicas é histológicas, y son: las materias colorantes básicas y las ácidas.

Entre las ácidas se colocan todas las sustancias en las cuales el principio colorante es ácido. Para esto no es necesario que ellas sean ácidas ni que reaccionen como estos últimos; pueden estar combinadas con una base (como el pierato amónico), formando sales. Distínguense cuatro clases de materias colorantes ácidas, á saber: 1.^a, las *fluoresceinas*, que comprenden la fluoresceína, la piroína, la eosina (tetrabromfluoresceína), etc.; 2.^a, los *cuerpos nitrogenados*, por ejemplo, el amarillo de Martius (sal de binitronaftol), el ácido picrico, la aurancia (sal amónica de exanitrodifenilamina); 3.^a, los *sulfitos*, por ejemplo, la tropeoleína, el Burdeos, el punzó; los derivados del azul de anilina solubles en el alcohol, el negro de anilina, etc.; 4.^a, el ácido rosólico, la alizarina, la nitroalizarina, la purpurina, la coruleína, quizá la hematoxilina, etc.

A las bases colorantes corresponden: la fuchsina (rosanilina), el violeta de metilo, el verde de metilo (ambos derivado metílicos de la rosanilina, el último mezclado de ordinario con el violeta de metilo), la trifenilrosanilina (azul de anilina bruto) y sus derivados, la azafraína, la magdala y además el pardo de Bismarck, el dalia y el violeta de genciana, empleados sobre todo en la coloracion de las bacterias.

Las materias colorantes básicas no se encuentran de ordinario en el estado de bases libres en el comercio, sino en el estado de sales; así, la fuchsina se encuentra en estado de cloruro ó de acetato de rosanilina.

Las materias colorantes básicas son casi exclusivamente aptas para colorear los esquizomicetos; y también sólo ellas tienen la propiedad de colorear los núcleos. Para no obtener una coloracion difusa de todo el tejido, despues de haber coloreado la preparacion, debe tratarse por soluciones que tengan más afinidad por la materia colorante que los mismos tejidos, pero ménos que los esquizomicetos (y los núcleos). Estas soluciones son precisamente el alcohol y el ácido acético diluido.

(1) Westphal, Schwarze, Spilling (*Bibliografía*). — Weigert. *Virchow's Arch.*, t. LXXXIV.

Algunos esquizomicetos sólo tienen afinidad por un pequeño número de sustancias colorantes; por eso, en la investigacion de los microbios aún desconocidos es preciso emplear sucesivamente las más diversas sustancias colorantes, ya despues de añadirles un poco de ácido acético, ya en solucion ligeramente alcalina. Los esporos no absorben las materias colorantes sino despues de ciertas manipulaciones. Para la mayoría de los micrococos son suficientes las materias colorantes de los núcleos (carmin, hematoxilina, anilinas básicas). Se coloran de rojo con los carmines que colorean á los núcleos, con la purpurina, la fuchsina, la magdalena, el rojo Magenta; de pardo, con el pardo de Bismarck y la vesuvina; de azul ó de violeta, por la hematoxilina, el azul de metileno, el violeta de metilo, el dalia, la genciana. Para muchos bacilos sólo son convenientes los colores de anilina que colorean al núcleo. Los que con más frecuencia se emplean son:

El *azul de metilo*, sobre todo en solucion débilmente alcalina (líquido colorante universal de Loeffler). Se prepara por medio de una mezcla formada por 1 c. c. de una solucion alcohólica concentrada de azul de metileno (que puede conservarse durante mucho tiempo) con 200 c. c. de agua destilada y tres á cuatro gotas de una solucion de potasa cáustica al 10 por 100. La mezcla debe filtrarse recientemente cada día y renovarse cada ocho días.

El *violeta de genciana* (BR del catálogo de la *Berliner Actiengesellschaft f. Anilinfarben*. Berlin, S. O.), en solucion acuosa al 1 por 100.

La *fuchsina* se conserva en solucion alcohólica concentrada y se emplea en solucion acuosa al 1:5.

El *violeta de metilo*, la *genciana* y el *dalia* presentan en un grado pronunciado la propiedad metacromática, es decir, que colorean los diversos elementos con matices diferentes del color fundamental, rojizo, hasta rojo, etc. El verde de metilo, mezclado de ordinario con el violeta de metilo, da con frecuencia matices azulados y á veces rosados.

Las dobles coloraciones permiten casi siempre distinguir mejor las bacterias de los núcleos. Preciso es mencionar la que se obtiene por medio del picrocarmin y la genciana, y que se funda en el hecho de que el carmin hace desaparecer la coloracion violeta de los núcleos y no la de los bacilos. Primero se ponen los cortes en una solucion de genciana, luégo en el alcohol; despues, para quitar éste, se llevan un instante al agua y, por último, á la solucion de picrocarmin de Weigert. Despues de permanecer media ó una hora en ésta, se ponen en el alcohol, en la esencia de clavo y en el bálsamo del Canadá. Entónces los núcleos se coloran de rojo y los bacilos de azul. Las masas actinomicósicas pueden colorearse de azul rojizo con la orchilla de Weddl y la genciana. (*Virchow's Arch.*, t. LXX.)

Los bacilos de la tuberculósia se coloran bien, sobre todo por el