

de tratarse por el ácido acético ó el alcohol, se ponen en contacto con el carbonato de potasa; entónces los núcleos, el protoplasma y, en general, todo el tejido animal se decoloran y sólo conservan su tinte particular los esquizomicetos (Koch).

II. — CULTIVO ARTIFICIAL DE LOS HONGOS INFERIORES

Para hacer el estudio completo de las propiedades de los microorganismos conocidos, es absolutamente indispensable hacer su cultivo. Con este fin se emplean como recipientes vasos de reaccion de paredes gruesas ó vasos de Buchner (Saftgläser), de 5 centímetros de diámetro, de cuello corto, ó tambien redomas de varios tamaños y, con preferencia, matraces de Erlenmeyer de fondo plano. Como cierre impermeable á los microorganismos se toma un tapon de uata de unos tres centímetros de largo y se mete en el cuello, dejando que sobresalga como un centímetro. Este tapon no debe estar muy prieto, á fin de que no se formen surcos que constituyan conductos permeables á los microbios. Pasteur ha introducido el uso de redomas pequeñas (matraces) cuyo gollete se cubre con embudito de cristal (B); en el tubo delgado de éste va el tapon de uata (A). Estas ampollas convienen sobre todo para los cultivos en los líquidos; entónces no es necesario quitar el tapon de algodón, con las partículas de polvo que se le adhieren; basta con levantar el embudito. Fol (1) emplea cierres dobles, que se componen de un tapon exterior de uata, que permanece intacto; en medio de él se encuentra un tubo de vidrio, adelgazado hácia abajo, el cual contiene asbesto en su extremo inferior y en el superior otro tapon de uata. Para inocular sólo se quita este último, y el asbesto se atraviesa por medio de una cánula enrojecida.

Sin embargo, de ordinario son completamente superfluas estas medidas de precaucion. Cuando se abren repetidas veces los matraces basta calentar con la llama de un mechero de Bunsen la parte del tapon que sobresale y que contiene el polvo, para alejar casi del todo el riesgo de ver que caigan los gérmenes en el interior.

Para ciertos casos en que se desea tener superficies más grandes de medio nutritivo empléanse cristalizadores de 1 á 2 centímetros de altura y de 4 á 6 centímetros de diámetro. Se conservan éstos en vasos cilíndricos de 15 á 20 centímetros de altura, en los cuales pueden levantarse fácilmente por medio de una lámina de laton encorvada; además, el cilindro se cierra por medio de un tapon de uata, como más

(1) *Arch. des sc. phys. et natur.* — Ginebra, 1884, t. XI.

arriba. Cuando se emplean para el cultivo placas ó cubre-objetos, basta conservarlos en los vasos de vidrio que cierren bien (1).

Substratos nutritivos. — Conforme á lo que dijimos más arriba acerca de las condiciones vitales de los hongos inferiores, deben contener los principios nutritivos necesarios sustancias que contengan carbono, nitrógeno y sales. Al mismo tiempo el valor de la solución nutritiva no

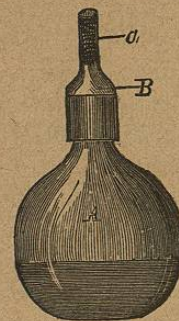


FIGURA 153. — Matraz de Pasteur.

sólo depende de la naturaleza de las sustancias, sino tambien de su cantidad, grado de concentracion, reaccion, oxígeno, etc.

Cuando se quiere cultivar los mohos y garantizarlos contra la penetracion de los esquizomicetos es preciso ante todo que la riqueza en agua sea moderada; por consiguiente, el substrato debe ser sólido; además, es preciso que la reaccion sea muy ácida. Para los sacaromicetos convienen más que nada los líquidos francamente ácidos (aun cuando mucho menos que los anteriores) que contengan azúcar; para los esquizomicetos los más convenientes son los substratos neutros ó alcalinos, ricos en agua. Para los mohos se eligen como medio nutritivo los cocimientos de ciruelas, de pasas, de estiércol reciente de herbívoros, de levadura adicionada con azúcar, rodajas de pan ázimo impregnadas con diferentes cocimientos. Cuando el grado de acidez de los substratos no es suficiente, puede aumentarse por medio del ácido tartárico (al 2-5 por 100) ó del ácido fosfórico (al $\frac{1}{2}$ -1 por 100). Para los sacaromicetos se eligen los cocimientos de malta, de mosto de cerveza, ó bien uno de los cocimientos enumerados más arriba, y se añade glucosa. Para los esquizomicetos se emplea la orina, la infusion de heno ó de carne y otras análogas, á las cuales se agregan cenizas de le-

(1) Para más detalles acerca de los accesorios para el cultivo de las bacterias, véanse los Catálogos especiales, sobre todo los de R. Muencke, Berlin, N. W., y H. Rohrbeck, Berlin, N. W.

vadura, de cigarros, etc., y se trata lo más posible de obtener una reacción neutra muy poco ácida ó alcalina.

Como solución nutritiva puramente artificial, Pasteur recomendaba en otro tiempo una formada por 100 partes de agua, 10 de azúcar candado, 1 de tartrato amónico y cenizas de una parte de levadura cuyo peso corresponda aproximadamente á 0,075 de la mezcla. Bucholtz reemplazaba en la misma solución la ceniza de levadura por $\frac{1}{2}$ gramo de fosfato potásico. Cohn había adoptado la composición siguiente: 0,1 gramo de fosfato potásico, 0,1 gramo de sulfato de magnesia cristalizado, 0,1 gramo de fosfato tribásico de cal, 20 gramos de agua destilada y 0,2 gramos de tartrato amónico. Estas soluciones nutritivas y otras análogas presentan ciertos defectos que ha señalado Nægeli. Después de numerosas experiencias que este autor ha hecho acerca del mecanismo de la nutrición de los hongos inferiores, recomienda las siguientes soluciones, que deben considerarse como normales para los esquizomicetos, y añadiéndoles ácidos y azúcar, pueden llegar á ser favorables para el desarrollo de los mohos y de los sacaromicetos:

1. Agua, 100 c. c.; tartrato amónico, 1 gramo; fosfato bibásico de potasa, 0,1 gramo; sulfato magnésico, 0,02 gramos; cloruro de calcio, 0,01 gramo. En lugar del tartrato amónico, puede elegirse el acetato, el lactato, etc., la asparagina y la leucina.

2. Agua, 100 gramos; peptonas ó albúmina soluble, 1 gramo; fosfato bibásico de potasa, 0,2 gramos; sulfato de magnesia, 0,04 gramos; cloruro de calcio, 0,2 gramos.

3. Agua, 100 gramos; azúcar de caña, 3 gramos; tartrato amónico, 1 gramo; sustancias minerales, como en el número 2.

Todos estos substratos nutritivos son más ó menos impropios para el cultivo de las bacterias patógenas. Evidentemente, éstas exigen siempre ciertas cantidades de albúmina y de peptonas y, á veces, también de azúcar. Además, son muy sensibles á las variaciones de composición del substrato nutritivo. En la mayoría de las especies, las condiciones favorables oscilan en estrechos límites y deben precisarse experimentalmente. Las soluciones que más convienen son: la infusión de carne (preparada como para hacer gelatina nutritiva); la infusión de carne con 1 por 100 de peptona y 2 por 100 de dextrosa; la leche y el suero, etc.; además, una serie de substratos nutritivos sólidos, blandos, sobre todo las patatas cocidas y la mezcla de soluciones nutritivas con agentes coagulados, como la gelatina, el agar ó el suero. Todos los substratos nutritivos deben tener una reacción ligeramente alcalina; cuando la reacción es muy ácida primitivamente, se obtiene esto por medio de una solución concentrada de sosa, y cuando aquélla es débil, por medio de una solución de bifosfato sódico.

Todos los substratos nutritivos, lo mismo que los vasos que los

contienen, antes de emplearse deben ser esterilizados por completo, es decir, desembarazados de los gérmenes viables. Lógrase esto calentando los vasos (tubos de ensayo con tapon de uata, etc.) en una estufa de hierro ó de cobre, caldeada durante una hora á 150 á 180°. La uata se pone entonces ligeramente morena. Siendo casi siempre muy diferente la temperatura en los diversos puntos de la estufa, se basa por lo general en la coloración de la uata para declarar terminada la esterilización. Los vasos más grandes se lavan con una solución de sublimado al 1/2000 y después, varias veces, con agua destilada esterilizada por ebullición, ó bien con alcohol absoluto. Los substratos nutritivos, después de introducirlos en los vasos esterilizados, se desembarazan de los gérmenes que pueden contener calentándolos en la estufa de vapor. Según la cantidad de sustancias, permanecen quince minutos á una hora en la corriente del vapor. Cuando se calientan las mezclas de gelatina durante demasiado tiempo, ya no se vuelven sólidas otra vez; por esta razón se emplea el caldeo discontinuo. Durante el primer día sólo se deja cinco minutos la gelatina en la corriente de vapor; en seguida se sostiene hasta el día siguiente á la temperatura de 20 á 30°; los esporos que permanecen en el líquido pueden germinar entonces. Se repite el segundo día el caldeo durante cinco minutos y se renueva otra vez al día siguiente. Respecto al suero, que debe conservarse claro y trasparente, no se utilizan sino temperaturas de 55 á 60° y se repite la operación durante varias horas cinco á seis días (véase más arriba).

Métodos de preparación de algunos substratos nutritivos. — Las patatas se ponen durante media hora en una solución de sublimado, de modo que se mate á los esporos que se adhieren á ellas. Después se lavan con agua destilada y se cuecen durante treinta á cuarenta minutos en la estufa de vapor. Después de enfriarlas en un vaso cubierto y esterilizado, se cortan por medio de un cuchillo, previamente enrojecido y enfriado. Los cultivos se hacen en los cortes recientes.

Infusión de carne y gelatina nutritiva. — Se pica un kilogramo de buena carne de buey sin grasa y se añaden dos litros de agua. Después de haber dejado reposar durante veinticuatro horas á 15 ó 20°, se decanta y se comprime con fuerza la carne para hacer salir de ella todo el líquido. Se pone entonces éste en matraces que se mantienen durante una hora en la estufa de vapor, y luego se filtra. Para obtener una solución nutritiva se añade á lo filtrado 1 por 100 de peptona, $\frac{1}{2}$ por 100 de cloruro sódico, y se neutraliza por medio de la sosa. Se calienta de nuevo el líquido, se filtra, se pone en frascos de cultivo, en los cuales se esteriliza de nuevo calentándolo durante veinte á treinta minutos. Cuando se quiere obtener un substrato sólido se añade, además de la peptona y del cloruro sódico, 5 á 10 por 100 de gelatina ó 1 por 100 de

agar-agar. Se disuelve la gelatina en caliente, se neutraliza, se calienta diez minutos en la estufa de vapor, luego se filtra, en todo caso por medio de un embudo de doble pared, en el cual hay agua caliente. Si lo filtrado no está limpio del todo, es necesario calentar otra vez y añadir una clara de huevo. Se vierte entonces el líquido clarificado en los tubos de reacción esterilizados, que se ponen después cinco minutos en la estufa de vapor. Se repite la esterilización en la estufa de vapor tres días seguidos. El agar-agar debe sostenerse durante diez á doce horas sobre una llama pequeña, de manera que se obtenga una ebullición continua; añadiendo agua se compensa el efecto de la evaporación. Se filtra entonces en caliente, ó bien se vierte todo en una probeta cilíndrica que se mantiene en agua caliente, hasta que las partículas que flotan en el líquido se hayan sedimentado. Entonces se deja coagular todo y se quita la parte superior, que está clara. Se la liquida por el calor y se vierte en los tubos, que estarán esterilizados por una permanencia de media hora en la estufa de vapor.

Suero.— Se recoge la sangre de carnero, en cuanto posible sea con todas las precauciones asépticas, en un vaso esterilizado, que tenga la forma de una copa grande de champagne, recubierto por una placa también esterilizada. Al cabo de cuarenta y ocho horas se quita, por medio de una pipeta, el suero claro y se lleva directamente á los vasos de cultivo. Caliéntanse éstos á una temperatura de 68 á 70°, es decir, hasta que se coagule el suero. La prueba que se hace poniendo estos tubos en la estufa á 37° revela que la mayoría han permanecido estériles. Cuando no ha sido posible tomar la sangre con todas las precauciones antisépticas, debe esterilizarse calentando varias veces á una temperatura de 55° (véase más arriba).

En lugar de matar á los gérmenes, se puede también algunas veces tratar de desalojar de ellos á los substratos nutritivos filtrándolos á través de yeso ó de porcelana (filtro Chamberland).

Todos los substratos nutritivos que deben emplearse para los cultivos necesitan, por último, antes de utilizarse, ser examinados desde el punto de vista de su pureza. Para eso, basta dejarlos reposar durante un tiempo bastante largo y algunas veces á una temperatura bastante elevada (30 á 35°); en estas condiciones, los medios perfectamente estériles no se alteran. Protégense los substratos nutritivos contra la evaporación poniendo una capa de cautchuc por encima del tapon de uata. Los medios nutritivos preparados con la gelatina sólo pueden ser expuestos á temperaturas de 20 á 25°; á temperaturas más altas se liquidan. Por el contrario, el agar-agar y el suero resisten temperaturas de 35 á 39°.

El transporte de los hongos al medio de cultivo debe hacerse con las mayores precauciones, quitando por medio de hilos de platino calen-

tados ó de tubitos de cristal una pequeña cantidad de los materiales que los contienen. También es preciso pasar por la llama el tapon de uata, antes de volverlo á poner. Por este procedimiento no siempre se evita la infección por los gérmenes extraños; pero como el riesgo de contaminación por el aire es en general mucho menor que el riesgo de contaminación por los gérmenes adherentes á los objetos, se ve que en la práctica hay bastantes probabilidades de obtener cultivos puros. En todo caso, es prudente tener cuidado de que el aire del laboratorio esté tranquilo, evitar las sacudidas, etc., y, eventualmente, humedecer los muros y el suelo del laboratorio. Las manos del operador deben lavarse cuidadosamente con la solución de sublimado.

Métodos especiales de cultivo.

Empléanse los cultivos en porta-objetos huecos y en la llamada cámara húmeda, sobre todo, para estudiar el estadio de desarrollo de las bacterias ya obtenidas en estado de cultivos puros.

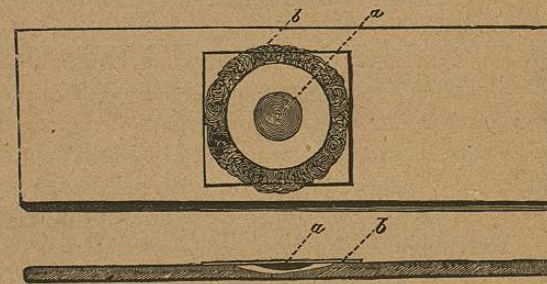


FIGURA 154.— *Cultivo en gotita.*

Estos cultivos se hacen de la manera más sencilla, poniendo una gota del líquido nutritivo en un cubre-objetos esterilizado, que se coge con una pinza también esterilizada; se pone todo en un porta-objetos hueco, de manera que la gota corresponda á la concavidad de éste. Se fija el porta-objetos por medio de una capa de vaselina, lo cual asegura un cierre hermético (fig. 141: *a*, gotita suspendida en la cara inferior del cubre-objetos; *b*, vaselina, que no debe tocar á la gotita). Puede observarse el desarrollo de las bacterias en la gotita, por medio de los más fuertes sistemas, ora con la preparación fijada empleando un porta-objetos que se pueda calentar, ora por medio del método de Watson-Cheyne (véase t. I, pág. 249). Para ciertos hongos es necesario permitir la penetración del aire, lo que no puede verificarse con el aparato que se acaba de describir.

Prazmowski ha encontrado una disposición que responde á este fin.

Consiste en hacer un conductito que vaya hasta la cámara húmeda y que no esté obturado por la vaselina. Estas cámaras húmedas no permiten observar durante largo tiempo, porque siendo imperfecto el cierre, se produce con suma rapidez la contaminación por los esquizomicetos extraños.

Las cámaras de V. Recklinghausen y de Brefeld constituyen los mejores aparatos de este género. Estas últimas, construidas especialmente para el cultivo de los hongos inferiores, consisten en un tubo estrecho de vidrio, ensanchado en ampolla en su parte media y comprimido de manera que los polos de ésta casi se toquen. Las paredes de la cámara sólo tienen el espesor de un cubre-objetos y están tan juntas que fácilmente pueden recubrirse en su interior por una tenue capa de líquido. En estas cámaras, perfectamente limpias y desengrasadas con éter y agua hirviendo, se absorbe entonces la solución nutritiva que contiene el germen que se va a estudiar, de manera que recubra muy poco la superficie de la cámara y que puedan observarse los gérmenes durante varios días sin dificultad.

Hácese cultivos más grandes, ora en substratos líquidos, ora en medios sólidos. Estos últimos convienen sobre todo más para obtener y conservar los cultivos en estado de pureza y presentan más facilidad para la separación de las especies. Hanse utilizado frecuentemente ya los medios sólidos, pero R. Koch ha sido el primero en emplearlos de una manera sistemática con el fin de obtener cultivos puros. Al paso que en los líquidos los micro-organismos que se han sembrado y los que han penetrado accidentalmente se mezclan unos con otros, y que los poco desarrollados apenas se reconocen, en un substrato sólido permanecen bien distintas las especies. Cuando se inoculan varios puntos de un medio nutritivo sólido, se ve formarse en cada uno de estos puntos una colonia que bien pronto es perceptible macroscópicamente. Si se desarrollan después esquizomicetos extraños, éstos forman por su parte colonias que no se mezclan de ordinario á las demás colonias, de las cuales se distinguen por la forma, el color y la consistencia. Pero si un germen extraño cae sobre una de estas colonias primitivas, y si se multiplica en el mismo terreno que ella, cambia muchísimo el aspecto exterior de ésta. Entonces, por el solo examen microscópico se podrá establecer si en un punto que se quiere elegir para una nueva inoculación se encuentran impurezas ó solamente la especie de que tratemos de ocuparnos. Sólo se inutilizan para una segunda inoculación los sitios en que las colonias se encuentran en estado de pureza. Precisamente en esta certeza con que pueden escogerse los materiales de reinoculación consiste la ventaja capital de los materiales sólidos sobre los líquidos. Una vez que se encuentran hongos extraños en los líquidos, multiplicanse, y es una verdadera casualidad si en una reinocula-

ción secundaria no se trasporta este germen extraño. Evidentemente no da garantías una previa comprobación microscópica, porque cuando el examen haga reconocer la presencia de gérmenes extraños, aún es muy difícil obtener un cultivo puro. Por el contrario, por medio de substratos nutritivos sólidos no es preciso evitar escrupulosamente que penetren gérmenes extraños; porque en este caso la elección de los sitios propios para proporcionar los materiales de inoculación, hecha con una inspección constante, da suficiente garantía acerca de la pureza de los cultivos secundarios.

Como substratos nutritivos sólidos son ya muy convenientes las patatas, pero son superiores los substratos transparentes, tales como la gelatina y el agar-agar, en los que la mayoría de las bacterias se desarrollan de una manera característica. Permiten reconocer las colonias no sólo á simple vista, sino también por medio del microscopio. Más arriba hemos indicado las diferencias esenciales entre los cultivos por picadura y los cultivos en surco. Sin embargo, difícilmente se aíslan las diversas especies que se encuentran en una mezcla nutritiva, por el solo hecho de los cultivos por picadura ó en surco. Cuando se trazan surcos numerosos y muy largos en la gelatina coagulada sobre porta-objetos (que pueden colocarse en el microscopio) lógrase á veces observar en ciertos sitios la aparición de colonias discretas, que pueden servir para hacer inoculaciones antes de que otras bacterias se hayan mezclado. Cuanto más se diluyen estos materiales, más colonias discretas se obtienen. Pero, en una mezcla que contenga numerosas especies, sucede con frecuencia que los gérmenes son arrastrados á lo largo del trazo de inoculación y varias especies se desarrollan en el mismo punto. Por el contrario, pueden aislarse con la mayor certidumbre las diversas especies por medio de los cultivos en placa. Este método consiste en mezclar los materiales que se van á examinar con la gelatina nutritiva liquefacta. Se tiene el cuidado de hacer varias diluciones. Se vierte la gelatina que contiene los gérmenes en una placa de cristal enfriada; la gelatina se solidifica entonces rápidamente. Cada uno de los gérmenes que se encuentran en la gelatina se fija en un punto determinado, y cuando no son demasiado abundantes se forma á expensas de cada uno de ellos una colonia suficientemente aislada y cuyos caracteres se determinan por el microscopio. Éstas sirven para inocular los tubos de cultivo.

Empléanse placas cuadradas ó rectangulares de 8 á 12 centímetros de longitud y de 6 á 8 centímetros de ancho. Se esteriliza un gran número á la temperatura de 18° y se conservan en vaso cerrado. Cuando se utilizan se toma primero la placa superior, pero se vierte la gelatina en la cara primitivamente inferior puesta hácia arriba.

De ordinario se emplean tres placas, que se colocan en una gran