

mesa de cristal dispuesta con toda horizontalidad por medio de un nivel de burbuja de aire. Cuando la temperatura del laboratorio es demasiado alta se coloca bajo la gran placa de cristal, entre ella y el tripode de tornillos de paso que la sostiene, un vaso que contenga agua fría (hielo). En las placas así dispuestas se vierte entonces la gelatina que contiene las materias que se han de estudiar. Esta mezcla se prepara de la manera siguiente: se toman tres tubos de ensayo que contengan unos 8 á 10 c. c. de gelatina nutritiva, la cual se liquida poniendo los tubos en agua á 40°. Se añade al primero una pequeña muestra de la sustancia que va á estudiarse, se agita con lentitud y con cuidado; se moja cinco á seis veces en el primer tubo un hilo de platino encorvado en anillo, trasportando cada vez el contenido al segundo tubo; se agita de nuevo y se procede de la misma manera con el segundo respecto al tercero. Se vierte entonces el contenido de cada uno de estos tubos en una placa y se distribuye la gelatina con uniformidad por medio de un tubo previamente calentado. Se deja á lo largo de los lados menores de la placa un espacio de centímetro y medio sin gelatina. En este sitio se colocan pequeñas tiras de cristal grueso, que se fijan por medio de algunas gotas de gelatina, y entonces se pueden superponer las diversas placas. Se dejan éstas bajo una campana de vidrio hasta que la gelatina se haya solidificado. Al cabo de diez á quince minutos pueden trasportarse á una cámara húmeda capaz de contener cinco ó seis placas. Esta cámara húmeda se halla esterilizada y revestida de papel de filtrar humedecido. Se transporta todo á una estufa á 22° y se observa cada doce ó veinticuatro horas. Primero no se abre la cámara húmeda; despues se estudian las placas por medio de aumentos desde 80 á 100 diámetros.

En las tres placas así preparadas casi siempre hay una que se puede utilizar, es decir, que contiene colonias aisladas fáciles de observar. A veces es tan pequeño el número de éstas que llega uno á pensar si sólo se tratará del resultado de una contaminación accidental. Una placa puede considerarse como buena cuando hay en ella diez colonias por lo ménos y quinientas á lo más. Si se trata de contar las colonias y no de hacer un exámen detallado de éstas, el número puede llegar hasta 5.000. Si no se llega á estas cifras ó se excede de ellas, es preciso repetir la experiencia.

Para el estudio de las más diversas cuestiones es esencial que, por medio de las colonias desarrolladas, se pueda averiguar el número de individuos que existían en una mezcla de bacterias. Debe tenerse el cuidado de añadir á la gelatina una cantidad conocida de los materiales que hay que examinar, y debe contarse con exactitud el número de las colonias que se hayan desarrollado poco despues. Esto se hace con facilidad, aún con las placas en que las colonias están más aglo-

meradas, por medio de una lámina de cristal cuadriculado. Se toma el promedio del número de las colonias contenidas en uno de los cuadrados y se multiplica por el número de éstas que recubren á la gelatina.

También se pueden hacer placas de agar-agar. Para esto se liquida primero por la ebullicion esta sustancia contenida en los tubos. Se deja entonces enfriar al baño maría hasta los 40° y luégo se añaden los materiales que van á estudiarse. No se puede emplear más que el agar líquido á 40°, y sólido de 38 á 39°. El agar en placa abandona fácilmente el agua, de suerte que sucede con frecuencia que toda la masa se desprende del cristal. Por esta razon, el vaso en que se conservan los cultivos debe recubrirse en su interior con papel de filtro seco. Evaporándose entonces con rapidez el agua, el agar permanece adherido á la placa.

Esmarch (1) ha indicado una modificación muy práctica del procedimiento indicado más arriba. Consiste en el empleo de tubos anchos, cuya superficie interior reemplaza á la placa. Para lograr este resultado se sostiene casi horizontalmente el tubo, al mismo tiempo que se le imprime un movimiento continuo de rotacion mientras se enfria. La gelatina mezclada con los materiales que se trata de estudiar se solidifica entonces en tenues capas en las paredes del tubo. De ordinario ciérrase éste por medio de un casquete de cautchuc y se deja flotar en agua fría. Con la mano derecha se le imprime el movimiento de rotacion.

Para contar las colonias basta entonces dividir con regularidad la superficie externa del tubo. La ventaja especial de este método consiste en el hecho de que para las colonias que se desarrollan con lentitud, la gelatina no se expone á la contaminación por los gérmenes del aire; pero, en cambio, es más difícil que con las placas el observar las colonias aisladas. Lo mismo sucede con la inoculación secundaria de los tubos. Así, pues, tal modificación no puede emplearse sino en ciertos casos (2).

Si se trata de estudiar todo lo posible todas las especies bacterias existentes en un medio, es preciso modificar las condiciones nutritivas cuando se puede. En este caso tienen importancia: la adición de azúcar, la modificación del grado de reaccion, la temperatura y el oxígeno. No conociéndose las condiciones nutritivas de gran número de bacterias, es preciso variar aquéllas tanto como sea posible.

(1) *Zeitschr. f. Hygiene*, t. I, núm. 2.

(2) Evidentemente, este método no puede emplearse con las especies que liquidan á la gelatina. — T.

Segun Liborius, para el cultivo de los anaerobios conviene, sobre todo, emplear gruesas capas de agar-agar, al cual se haya añadido el 2 por 100 de dextrosa. Con este fin, se llenan los tubos de ensayo hasta una altura como de unos 10 centímetros y se reparte la sustancia que se va á examinar en la masa liquidada á 40°. Las colonias de anaerobios se desarrollan entónces en las capas profundas. O bien, se emplean tubos en los cuales se haya expulsado todo el aire por medio del hidrógeno. Tienen la forma que indica la figura 155.

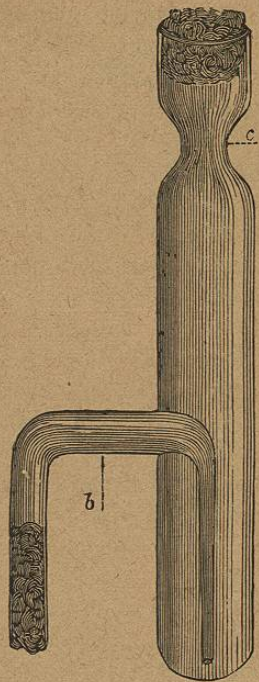


FIGURA 155.—Tubo para cultivar los anaerobios.

Se llenan de agar hasta la altura del tubo lateral. Los materiales que van á estudiarse se introducen por la abertura superior, se hace pasar una corriente de hidrógeno por el tubo lateral y luego se cierra á la lámpara en *a* y en *b*. Los anaerobios más perfectos se desarrollan muy bien en estos vasos. Si se necesita que puedan observarse las colonias al microscopio y si deben servir para practicar inoculaciones, entónces se emplean cristalizadores que contengan una capa de agar de centímetro y medio de espesor, que se conserva en vasos de hierro herméticamente cerrados y provistos de espitas con llave, por las cua-

les se hace pasar una corriente de hidrógeno. (Para más detalles, véase el trabajo de Liborius, *Zeitschrift für Hygiene*, I, 1.)

Si se trata de bacterias que no se desarrollan en estos substratos nutritivos, sino sólo en los líquidos, es más difícil aislarlas. En este caso, se procede segun el método de Klebs, es decir, por el cultivo que se llama fraccionado, que consiste en dejar que las bacterias se desarrollen en el primer cultivo, en trasportar una pequeña cantidad de éste á un segundo y continuar así toda una serie. En realidad, obtiéndose de esta manera cultivos puros del ó de los hongos que se multiplican con más rapidez en condiciones dadas, al paso que disminuyen cada vez más y más las probabilidades de que se desarrollen aquellos que lo hacen con mayor lentitud. Pero, por este mismo motivo, el método no es nada práctico; en efecto, no siempre nos interesan más los gérmenes que se desarrollan con más rapidez. Ciertamente es que variando las condiciones exteriores, y sobre todo la temperatura, se puede favorecer el desarrollo de tal ó cual especie; pero este procedimiento siempre es de larga duración é inseguro, porque conocemos poquisimo las condiciones más favorables para el desarrollo de las diversas especies.

El principio de las diluciones es preferible, con mucho. Este principio fué recomendado primero por Brefeld, luego por Nægeli y por Buchner. Segun Brefeld, se toma una pequeña cantidad de los materiales que se van á estudiar y se mezcla con agua destilada esterilizada; se lleva tan lejos la dilucion, que en una muestra tomada por medio de una aguja sólo se encuentre un germen. Cuando por el examen microscópico se está convencido de que se ha llenado esta condicion, se trasporta esta muestra á un vaso de cultivo. En este caso, hay muchas posibilidades para que en un gran número de vasos se desarrolle únicamente el germen contenido, sobre todo en la materia primitiva. En algunos de los vasos sucederá de seguro que se desarrollarán gérmenes que se hallaban en minoría en la materia que se trata de estudiar.

Si quieren aislarse mohos cuyos esporos son difíciles de ver, se empleará en lugar de agua una solución nutritiva. Se dejan germinar los esporos y sólo entónces se procede á la dilucion (comprobando por medio del examen microscópico).

Mas, para los esquizomicetos, el examen microscópico es inútil casi siempre, en atención á que los esporos y hasta los individuos desarrollados son demasiado pequeños para que pueda comprobarse la presencia de un germen único en una sola gota. Aquí no puede obtenerse por la imagen microscópica sino un punto de apoyo aproximativo para la dilucion ulterior. Además, es preciso suponer en este procedimiento que los hongos interesantes se hallan en cantidad relativamente gran-

de. En el caso de que se trate de aislar gérmenes patógenos, esta hipótesis quizá sea justa; pero allí donde existan gran número de saprofitos de especies variadas, pocas esperanzas habrá de lograr por esta vía una separación perfecta.

A veces podrá prestar grandes servicios el combinar los métodos de las placas y de las diluciones.

El método de los cultivos puros debe adquirirse necesariamente por un aprendizaje. Para este efecto, se puede recomendar el cultivo del *bacillus prodigiosus* en patata, gelatina, etc., á diferentes temperaturas; el cultivo del *bacillus anthracis* en patata, gelatina-peptona, suero y una serie de generaciones en substratos líquidos, á diversas temperaturas; el cultivo á baja temperatura (15 á 20°) del *aspergillus flavescens* en patatas, etc. Si aquellos que se ocupan de los cultivos de hongos y que tratan sobre todo de resolver esta difícil cuestión del aislamiento de las especies patógenas se ejercitaran ántes de una manera conveniente, aparecerían muchas ménos de esas publicaciones tempranas, tan poco provechosas para la ciencia.

Cuando se ha logrado obtener el cultivo de un hongo, aún es necesario establecer cuáles son sus caracteres morfológicos y biológicos. Es preciso hallar cuáles son las sustancias y la temperatura que mejor les convienen y en qué medida les es necesaria la presencia del oxígeno. Es menester, además, ver si provoca alguna fermentación y, con este fin, es preciso añadir á las sustancias nutritivas las materias fermentescibles más importantes (hidratos de carbono, alcoholes, ácidos grasos, albúminas, etc.). También hay que estudiar las propiedades patógenas que puedan corresponder á este microbio y, para eso, practicar numerosas inoculaciones en los ratones, las cobayas, los monos, etc.

Deben hacerse estas investigaciones por medio de dosis más ó ménos fuertes, y las inoculaciones unas veces serán superficiales y otras, por el contrario, se harán por inyección en el tejido celular subcutáneo ó en la sangre. Si los animales se ponen enfermos ó se mueren, es preciso entonces hacer por medio de su sangre inoculaciones y dejar probada la identidad de los hongos encontrados y de los que se inocularon. Todas estas investigaciones deben hacerse gran número de veces. Además, es preciso estudiar las condiciones de extinción de estos microorganismos, y en especial la atenuación de las propiedades patógenas; en fin, establecer cuáles son las condiciones exteriores que producen con más facilidad su muerte y cuál es el mejor desinfectante que les conviene.

### III. — EXÁMEN BACTERIOLÓGICO DEL AIRE, DEL AGUA Y DE LA TIERRA

a) Aire.—En vano se intentó en otros tiempos, por la fijación en superficies viscosas y por el examen microscópico, tener una noción exacta del número y especies de bacterias contenidas en la atmósfera. Actualmente se emplean métodos que tienden lo primero á producir el desarrollo de las especies bacterianas ántes de contarlas. Miquel (véase la BIBLIOGRAFÍA) ha empleado con este fin un substrato nutritivo líquido, un caldo preparado poco más ó ménos segun la fórmula dada más arriba. Lo coloca en un gran número de pequeños aparatos que presentan la forma indicada por la figura 156.

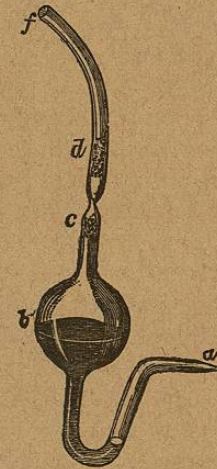


FIGURA 156. — Aparato de Miquel para el examen del aire.

Cuando se procede al examen del aire éstos se esterilizan y se ponen en un pie. La extremidad *f* se reúne á un aspirador; la punta *a* se calienta de nuevo y despues se rompe. Se deja pasar á través del caldo un volumen de uno á tres litros de aire, y luego se cierra el extremo *a*. Se sopla entonces el tapon de uata *c*, que puede haber retenido algunos gérmenes en el líquido, y se ponen los aparatos en una estufa. Para cada ensayo se utilizan veinte á treinta de estos aparatos. Al cabo de un tiempo muy largo puede verse en cuántos de estos aparatos se ha manifestado una alteración del caldo y, por consiguiente, un desarrollo de bacterias. Si esto no ha sucedido en todos, sino sólo en parte de estos aparatos, se admite que en cada uno de ellos ha pe-