

CAPÍTULO III

Vinos. — Vinos torcidos. — Vinos grasos. — Amargor. — Cerveza. — Falsificación de la cerveza.

BIBLIOGRAFÍA.—Pasteur: *Etudes sur le vin.*—*Etud. sur la bière.*—Macé: *Subst. alim.*—Fleurent: *Analys chim.*—Wurtz: *Bactériol.*—Cazeneuve: *Color. des vins.*

Vinos. — El estudio microscópico de un vino no puede facilitar datos sobre su constitución, la cual únicamente puede determinarse por el análisis químico. A lo más se puede tratar de utilizar con este objeto algunas indicaciones facilitadas por el examen de los depósitos.

Pero por otra parte sólo el microscopio puede revelar la naturaleza de ciertas alteraciones muy especiales que experimenta este líquido bajo la influencia de la pululación en su masa de microorganismos particulares que se desarrollan á sus expensas. Esta importante cuestión de las *enfermedades del vino*, tan bien dilucidada en 1866 por las notables investigaciones de Pasteur, tiene interés notablemente práctico. Las observaciones están tan bien hechas, los datos nuevos establecidos de una manera tan precisa, que hasta hoy, á pesar del largo espacio de tiempo pasado, nada se ha podido añadir ó modificar. Pasteur ha llegado á demostrar la falsedad de las opiniones que han corrido antes que él, admitiendo que el vino es un líquido en estado de trabajo molecular constante, y que cuando contiene materia albuminoide ésta puede modificarse ó alterarse por causas desconocidas y provocar entonces las diversas enfermedades del vino.

En este sentido no podemos hacer nada mejor que reproducir las siguientes líneas en las cuales el Maestro reasume su opinión (1).

«Los principios que expongo en esta obra y que creo haber deducido de una observación atenta de los hechos, son muy diferentes de los que acabo de dar á conocer.

(1) *Estudios sobre el vino, sus enfermedades y causas que las provocan.*

»En primer lugar trataré de demostrar que el vino no *trabaja* por sí mismo tanto como se supone. Sin duda el vino, siendo una mezcla de diversas sustancias entre las cuales hay ácidos y alcohol, debe formarse con el tiempo, produciendo éteres particulares; acaso reacciones del mismo orden toman origen entre los otros principios igualmente contenidos en el vino. Pero si no se puede negar la exactitud de tales hechos porque están establecidos sobre leyes generales, yo creo que se hace de ellos una falsa aplicación cuando se les quiere hacer servir para darse cuenta del envejecimiento de los vinos, de sus enfermedades, en una palabra, de los principales cambios de buena ó mala naturaleza de los cuales evidentemente son asiento.

»Uno de los principales resultados de mi trabajo es precisamente establecer que las variaciones que se observan en las cualidades del vino abandonado á sí mismo, sea en tonel, sea en botella, reconocen por causa influencias exteriores á la composición normal. Resultará, según yo espero, del conjunto de mis observaciones y de mis experimentos que el envejecimiento de los vinos reside esencialmente en fenómenos de oxidación debidos al oxígeno del aire, que se disuelve y penetra en el vino de diversas maneras. Yo estableceré además que un segundo origen de los cambios propios del vino no debe buscarse en la acción espontánea de una materia albuminoide, modificada por causas desconocidas, sino en la presencia de vegetaciones parasitarias microscópicas que encuentran en el vino condiciones favorables á su desarrollo, y que lo alteran, sea por la substracción de lo que ellas le quitan para su propia nutrición, sea principalmente por la formación de nuevos productos que son un efecto de la multiplicación de estos parásitos en la masa del vino.

»De aquí la consecuencia clara y precisa de que debe bastar para precaver las enfermedades de los vinos encontrar los medios de destruir la vitalidad de los gérmenes de los parásitos que las constituyen, de manera que se impida su desarrollo ulterior.»

En lo que vamos á decir nos acomodaremos exclusivamente á la doctrina del gran Maestro, cuyas enseñanzas constituyen hoy la revelación científica más brillante, de la cual tenemos la honra de ser entusiastas partidarios.

El vino es atacado por muchos microorganismos pertenecientes unos al grupo de las levaduras y otros al grupo de las bacterias. Estos microorganismos proceden del aire ó de los recipientes que contienen el líquido. Con frecuencia preexisten en el depósito que forma el vino al reposarse, y se encuentran allí en el estado de vida latente, no pasando á la vida activa sino cuando sobrevienen condiciones favorables.

El estudio microscópico de los depósitos del vino puede proporcionar excelentes datos. Estos depósitos son de tres especies, que pueden observarse separadas ó mezcladas.

1.º Estos depósitos están constituidos por cristales de sales, bitartrato de potasa ó tartrato neutro de cal. De ordinario estos cristales no se adhieren á las paredes de las botellas, sino que se amontonan en el punto declive en conjuntos granulosos ó sedosos según la naturaleza y la forma de los cristales.

El bitartrato de potasa cristaliza de ordinario en largas agujas prismáticas, aisladas ó reunidas en núcleos alguna vez radiados; estas agujas son alguna vez muy largas y sedosas, formando ligeros copos blancos. El tartrato de cal da gruesos prismas que presentan frecuentemente facetas hemidricas. (*Lámina I.*)

2.º Este depósito es debido á la precipitación de la materia colorante, que se hace insoluble por un efecto de oxidación y aparece al microscopio bajo tres aspectos distintos:

a) En hojas translúcidas, coloreadas en amarillo obscuro más ó menos marcado, y alguna vez con un tinte violeta;

b) Otras veces se compone de granulaciones en pequeños conjuntos amorfos, apretados los unos contra los otros y formando una capa adhesiva de un rojo obscuro ó violeta;

c) Estas granulaciones toman á menudo una estructura tan regular, que simulan formas elementales de ciertos microorganismos, hasta el punto de que alguna vez han sido tomadas por tales. Estos tres estados físicos se encuentran con frecuencia reunidos.

3.º Estos depósitos están formados por microbios que pueden desarrollarse á expensas del vino alterándolo de diferentes maneras. Estos son los que más interesa conocer.

En el vino sólo se encuentran, por regla general, pocas especies de levaduras. Las que han presidido á su formación y que abundan en el mosto, han sido arrastradas por los depósitos y desalojadas al *trasegar* los vinos. Una especie se desarrolla sin embargo con frecuencia en el vino, en cuya superficie forma la película blanca conocida con el nombre de *flores del vino*. (Véase pág. 522, tomo I.)

Las bacterias que producen alteraciones diversas en los vinos son poco numerosas; á las especies de este grupo son debidas las enfermedades del vino conocidas por los nombres de *acidez*, *vinos torcidos*, *vinos grasos*, *amargor de los vinos*, etc.

Vámos á estudiar estas alteraciones y su reconocimiento microquímico.

Acidez. — Es una alteración grave del vino y desgraciadamente la más común, produciéndose en ella el fenómeno conocido bajo las denominaciones de *vino ácido*, *vino picado* ó *vinagre*. Es debida al desarrollo en este líquido de un bacilo especial designado por Pasteur con el nombre de *Mycoderma aceti*, ó fermento del vinagre (tomo I, pág. 522). Este fermento se encuentra muy extendido en la naturaleza y se le observa muy fácilmente exponiendo al aire líquidos alcohólicos débiles, pobres en materias orgánicas y aun mejor ligeramente acidificados previamente con un poco de ácido acético.

No es solamente una sola especie de bacterias las que desarro-

lla esta curiosa propiedad utilizada para la fabricación del vinagre; muchas bacterias poseen esta propiedad y pueden servir para lo mismo.

El fermento acético de Pasteur, al cual es debida la acidez de los vinos está formado por bastoncillos cortos y gruesos que miden 3μ de largo por 1.6μ de ancho. Estos bastoncillos que parecen ligeramente estrangulados en su medio y formados por la reunión de dos glóbulos, se encuentran de ordinario reunidos en rosarios más ó menos largos, cortos ó sinuosos. (*Lámina I.*)

Este fermento se desarrolla muy rápidamente en el vino, produciendo en su superficie un velo uniforme, aterciopelado, muy diferente del producido en las *flores del vino*. Este velo transparente y membranoso adquiere espesor poco á poco y se hace opaco. Su consistencia es grande y resiste fuertemente á la presión del dedo en lugar de disociarse en seguida como sucede en el vino, pudiendo llegar á un gran espesor. Si se desarrolla en un vino claro, toma un tinte rojizo debido á la fijación de una parte de la materia colorante. Tomando una pequeña parte y estudiándola al microscopio se reconoce que está formada por numerosas filas longitudinales de bastoncillos unidos por una materia pegajosa y consistente.

El fermento acético se desarrolla á menudo juntamente con las *flores del vino*, en cuyo caso se retarda su pululación y el mal es todavía remediable. En tal caso es necesario hacer con precaución muchos *trasiegos* y encerrar el vino en receptáculos bien limpios. Cuando el fermento se desarrolla solo, ó cuando llega á sobreponearse á las flores que hace desaparecer, en tal caso el vino sólo sirve para hacer vinagre.

Vinos torcidos. — En los meses de grandes calores sucede con frecuencia que los *vinos se tuercen*. En este caso se enturbian y si se agitan en un tubo de ensayo se observan ondas sedosas en diferentes sentidos. Los toneles experimentan la influencia de una presión interna y llegan hasta abombarse sus fondos. Si se practica un *falsete*, el vino salta con fuerza y muy lejos. Su sabor se hace desagradable y su color cambia, pudiendo llegar hasta el violado, de donde toma el nombre de *vino azul*. Esta alteración del vino es debida sin excepción alguna á filamentos de longitud variable, que por regla general miden menos de 1μ de diámetro y están representados en nuestra lámina I.

En cuanto al depósito del tonel, se halla constituido por un conjunto de estos filamentos, á menudo muy largos, ligados los unos con los otros, impregnados de materia colorante y formando una masa negruzca, glutinosa, que se desarrolla en hilos mucosos cuando se la retira por medio de un tubo afilado sumergido hasta el fondo del tonel ó de la botella.

Esta enfermedad está por tanto constituida por una fermentación debida á un fermento figurado especial y bajo la influencia del desarrollo de este parásito experimentan los vinos estos cambios

profundos en su sabor y en su calidad. La acción del fermento da lugar á desprendimiento abundante de ácido carbónico, que produce el *empuje* del que hemos hablado.

Al principio es fácil de reconocer esta enfermedad; tomando una pequeña cantidad de vino se puede reconocer en una gota la presencia de los filamentos largos característicos. Cuando éstos son poco numerosos es preferible dejar reposar el líquido durante algunas horas en un vaso cónico y observar las últimas gotas que quedan después de decantación. En los depósitos recogidos de los vinos embotellados y atacados por esta enfermedad, se encuentran los mismos filamentos más ó menos largos, mezclados con frecuencia con células de levaduras, que son células del fermento ordinario del vino, como también el *Saccharamyces ellipsoideus*, y cristales de bitartrato de potasa y de tartrato neutro de cal. (*Lámina I.*)

Este fermento es muy común en toda especie de vinos, superiores ú ordinarios, y se le encuentra á cada momento en el examen de depósitos de vinos sanos al parecer. Sólo necesita condiciones favorables para su desarrollo, entre las cuales es la primera una temperatura bastante elevada.

Según Pasteur, nada es más fácil que reconocer si un vino está predispuesto para contraer la enfermedad que nos ocupa. Al efecto, se abre la llave adaptada al tonel, y se desprecian las primeras porciones del vino que sale; se saca después, de nuevo, un vaso del líquido que se deja reposar algunas horas, decantándolo entonces y examinando al microscopio las últimas gotas que quedan en el vaso. Por poco que el vino esté afectado, estas gotas ofrecen numerosos filamentos. Con frecuencia el examen atento de una gota de vino, sin esperar á que se deposite, basta para reconocer si ha experimentado ya un principio de enfermedad.

El examen del depósito del tonel no es menos importante cuando se hace en diferentes intervalos. Para esto se quita el tapón y se introduce hasta el fondo un tubo de cristal, sirviéndose de él como de un *catavinos*. Si en la superficie del vino hay *flores*, éstas cubren las paredes exteriores del tubo al sacarlo del tonel. Es necesario entonces limpiar el tubo exteriormente con un trapo y dejar perder las primeras porciones que salgan de él antes de observar en el microscopio. Entonces es fácil juzgar de la presencia del parásito en el depósito formado después del último trasiego ó del último examen microscópico.

Este parásito existe por regla general en el vino desde el principio y emplea un tiempo muy variable en manifestar su acción, según las circunstancias de medio. Uno de los mejores efectos de los trasiegos repetidos consiste en despojarlos de estas causas de alteración, dejando estos fermentos en los *posos* ó depósitos.

Vinos grasos. — Es ésta una enfermedad muy frecuente en los vinos blancos, que se declara en los toneles y en las botellas, aun los mejor acondicionados.

El vino atacado se enturbia, se hace filamentososo como el aceite cuando se le transvasa; es untuoso al tacto y hasta llega á ser algo viscoso; su sabor es repugnante y desagradable.

Esta enfermedad de los vinos no es absolutamente producida, como se ha creído durante mucho tiempo, por la precipitación de una substancia glutinosa, más ó menos análoga á ciertos principios del gluten de trigo, depositada en los vinos bajo la influencia de causas desconocidas. Esta enfermedad es una fermentación accesoría debida al desarrollo de un parásito cuyo germen debe proceder de la uva, y probablemente de ciertos granos de uva que se han podrido sobre la cepa por efecto de este mismo parásito ó de una de sus variedades ó metamorfosis.

El parásito que abunda en el vino enfermo se compone de elementos esféricos de un μ de diámetro medio, con variaciones en más ó en menos. Estos elementos raras veces están aislados, sino reunidos de dos en dos en gran número, formando largas cadenas flexuosas (*Lámina I*). En el vino embotellado se encuentra el parásito en todo el líquido y en el depósito. Durante la vendimia puede formar un velo en la superficie del líquido en los toneles, como sucede con el fermento acético.

Este fermento segrega una materia gomosa particular que se ha llamado *viscosa* y que da al líquido su consistencia especial.

Amargor. — Es ésta una enfermedad que ataca principalmente á los vinos viejos. Al principio el vino se hace empalagoso y desarrolla un olor especial y característico. Poco después aparece el sabor amargo, débil al principio y que va pronunciándose cada vez más, cargándose el líquido del gas ácido carbónico.

Si se examina al microscopio una gota de vino en pleno periodo de amargor, se encuentran en gran abundancia bastoncillos bastante largos reunidos frecuentemente en largas hileras (*Lámina I*). En los vinos embotellados, en los cuales el amargor ha empleado mucho tiempo para desarrollarse, el parásito que se encuentra en el depósito tiene forma un poco diferente. Está formado por una especie de ramajes nudosos, de diámetros más ó menos grandes, en la relación de 1, 2 ó 3, más ó menos articulados, incoloros ó débilmente coloreados de rojo, de un tinte claro vivo ú oscuro muy marcado. (*Lámina I*.)

Estos filamentos pueden constituir por sí solos todo el depósito, ó bien estar asociados con láminas de color uniformes, ó con conjuntos mamelonados ó con cristales. Es muy posible separar este fermento viejo de la materia colorante que incrusta su membrana, tratándolo por el alcohol ó el agua acidulada. En este caso desaparece la coloración roja ú oscura, disminuye el diámetro y aparece el aspecto de los filamentos jóvenes.

Cerveza. — Una buena cerveza límpida, examinada al microscopio, no debe presentar sino algunas células raras de *Levadura de cerveza*, *Saccharomyces cerevisiæ*. Estas células son casi siempre

ovales, alguna vez redondeadas, y miden regularmente de 8 á 9 μ en su diámetro mayor. Su membrana delgada, rígida, contiene un líquido turbio, que presenta uno, dos ó tres vacuolos claros.

La cerveza es una de las bebidas más delicadas, y sujeta, acaso más que el vino, á alteraciones del mismo orden y provocadas por las mismas causas, por la presencia de microorganismos que pululan á expensas de este líquido. Esta facilidad de alteración es frecuentemente debida á la proporción relativamente elevada de materia albuminoide que contiene la cerveza. Puede decirse que una cerveza es tanto más alterable cuanto se emplea para prepararla una cebada mas rica en substancias nitrogenadas.

Las alteraciones de la cerveza son debidas á microorganismos inferiores pertenecientes á los mismos grupos que los que hemos encontrado en el vino, los cuales pululando en la cerveza bajo condiciones favorables, determinan, á expensas de las materias azucaradas, y sobre todo, de las materias albuminoides, fermentaciones secundarias, que modifican completamente las cualidades del líquido. Estos organismos son levaduras ó bacterias.

El *Saccharomyces mycoderma* ataca frecuentemente las cervezas, sobre todo á las que son muy débiles en alcohol, determinando flores completamente semejantes á las del vino, y presentando los mismos inconvenientes por la destrucción de pequeñas cantidades de alcohol.

El *Saccharomyces exiguus*, común en las fermentaciones de los frutos, puede también desarrollarse en las cervezas. Entonces el líquido se hace opalino, verdoso, y se dice que tiene la *enfermedad verde*. Después de algún tiempo se clarifica, pero pierde su sabor primitivo tomando un gusto vinoso. Las células apenas miden 5 μ de largo por 2'5 μ de ancho.

Alguna vez se encuentra en la cerveza el *Saccharomyces apiculatus*, fermento muy común en las frutas. Sus células se reconocen muy fácilmente por su forma; son elipsoides, de 6 μ de largo por 3 μ de ancho, y presentan en cada extremidad una pequeña salida, un apículo, que les da el aspecto de un limón.

Los *Saccharomyces Pastorianus*, I y III, de Hansen, vuelven las cervezas turbias y amargas.

Las bacterias que contribuyen á la alteración de las cervezas son, en su mayor parte, las mismas que se observan en las enfermedades de los vinos, y con frecuencia las alteraciones producidas son las mismas.

El *fermento acético* determina las mismas modificaciones que en el vino, transformando el alcohol en ácido acético. Su desarrollo produce las cervezas *agrias* ó *picadas*.

El *fermento láctico*, que no se encuentra en los vinos, es común en las cervezas, á causa de su riqueza en productos hidrocarbonados. Sus elementos son cortos bastoncillos que miden por término medio 1'7 μ por 0'6 μ , aislados ó reunidos casi siempre de dos en

dos y alguna vez en cadenas cortas. Este fermento da á la cerveza un sabor agrio y un olor desagradable.

La enfermedad de la *grasa* ó *filaje* se observa á menudo en la cerveza, siendo producida por los mismos organismos que en el vino, esto es, por bacterias redondas reunidas en cadenas. También puede ser producida por otras bacterias en bastoncillos pertenecientes á varias especies. El *Bacillus viscosus* y el *Actinobacter polymorphus* de Duclaux parecen ser los más frecuentes.



FIG. 7.^a

Colonia de *Proteus vulgaris* sobre placa de gelatina.

Las *sarcinas* se desarrollan á menudo en las cervezas, reconociéndolas fácilmente por su aspecto. Los elementos redondos están generalmente reunidos de cuatro en cuatro en pequeñas masas cúbicas características, las cuales provocan la aparición de un olor algo pútrido y de un sabor áspero un poco ácido. Una de estas especies parece que produce la viscosidad del líquido.

Ciertas bacterias de la putrefacción, bajo la forma de bastoncillos largos y movibles, pueden invadir las cervezas mal fabricadas, apareciendo de ordinario desde el principio de la fabricación. En tal caso, el líquido desarrolla un fuerte olor pútrido y un sabor dulce y desagradable. En tal cerveza se ha encontrado una especie cercana de las bacterias designadas con el nombre de *Proteus*, comunes en las aguas contaminadas por materias putrefactas. (Figura 7.^a)

Por último, la cerveza puede *torcerse* como el vino y volverse amarga. Estas alteraciones son debidas á los mismos parásitos que hemos estudiado anteriormente.

Por regla general, todos estos organismos peligrosos provienen de la levadura impura que se haya podido emplear. Se comprueba fácilmente en el microscopio la presencia de tales elementos en

este producto; por eso conviene mucho que los fabricantes de cerveza estudien con cuidado la levadura y comprueben á menudo su pureza.

En los depósitos que deja una cerveza abandonada al reposo se pueden encontrar elementos diversos procedentes de los productos utilizados en la fabricación. Los granos de almidón y los residuos celulares de los granos del cereal empleado son muy comunes, como ya hemos visto al tratar de estos productos. También se encuentran, aunque con menos frecuencia, partes provenientes de los elementos glandulares del lupulino en diversos grados de su desarrollo.

Falsificaciones de la cerveza. — Frecuentemente se falsifica este líquido por la adición de varias substancias que alteran sus condiciones higiénicas. Es común la adición de la glucosa, y para descubrir este fraude se evaporan en el vacío 250 cc. de la cerveza sospechosa; se precipita la dextrina por el alcohol absoluto y se la dosifica, debiéndose encontrar en exceso con relación á la glucosa. Si sucede lo contrario, se puede asegurar que se ha añadido glucosa. En este caso la cantidad de alcohol en peso será superior á la del extracto, y se encontrará en las cenizas una proporción notable de sales de cal, de sodio y de magnesio.

Cuando la alteración se ha producido añadiendo ácido salicílico, se trata la cerveza añadiendo algunas gotas de ácido sulfúrico, agitando después el todo con el éter lavado ó el alcohol amílico. Se decanta la capa etérea y se la evapora. Si se ha añadido al ácido salicílico algunas gotas de percloruro de hierro muy dilatado, producirán una marcada coloración de violeta.

Se emplea generalmente como agente de conservación de la cerveza el bisulfito de cal de densidad de 1'67 á la dosis de 1 litro por 10 hectolitros de cerveza. Para encontrar el fraude se toman 50 cc. de cerveza y se añaden 5 gramos de ácido sulfúrico puro, haciendo pasar una corriente de ácido carbónico y calentando hasta los 50 grados. Se hace pasar el gas á un tubo que contenga agua de bromo con un poco de cloruro de bario. Si se forma un precipitado de sulfato de barita, se puede deducir que se ha empleado el bisulfito de cal.

También es frecuente substituir el principio amargo del lúpulo con materias extrañas como el ácido pírico, la hiel de buey, el áloes, la cuasia amara, la salicina, la cubeba, la nuez vómica, el musgo de Islandia, etc.

Para descubrir estas falsificaciones se sigue la marcha siguiente:

- 1.º Se evapora á un calor mediano dos litros de cerveza hasta que el líquido quede reducido á la consistencia de jarabe.
- 2.º Este jarabe se introduce en un frasco de cristal esmerilado de ancha boca, con cinco veces su volumen de alcohol á 95º.
- 3.º Se deja 24 horas en contacto agitando el contenido algunas veces en este tiempo.

4.º Se decanta el alcohol reemplazándolo de nuevo y se deja aún otras 24 horas en contacto agitando con frecuencia.

5.º Se decanta todavía y se destila el alcohol al baño maría después de filtración.

A una parte del extracto alcohólico se añaden tres partes de agua, y poniendo el líquido en el baño maría se introduce en él un mechón de lana. Después de una hora se le retira y lava con agua y se comprueba si el color amarillo que ha tomado es debido al ácido pícrico, para lo cual se emplea el sulfuro de amoníaco que debe hacerlo virar al rojo.

El resto del extracto se agita durante algún tiempo con 6 ó 7 partes de bencina pura. Se decanta y se la reemplaza por una nueva porción, se reúnen los dos líquidos y se destila. Queda entonces un barniz que se divide entre tres cápsulas de porcelana. En la primera se vierten algunas gotas de ácido nítrico de una densidad de 1.350. Si se produce una coloración roja, el líquido contendrá bencina.

En la segunda cápsula se vierten algunas gotas de ácido sulfúrico concentrado, y si resulta una coloración violeta, el líquido contendrá colocintina.

En la tercera cápsula se pone un cristal de bicromato de potasa y un poco de ácido sulfúrico. Si se obtiene el color de púrpura, será indicio de la estriknina.

Después se calienta al baño maría el jarabe no disuelto en la bencina y se agita con el alcohol amílico puro. Si este último se colorea en amarillo ó en rosa vinoso y además es amargo, se deja evaporar una pequeña cantidad de la solución sobre una placa de cristal á la temperatura ordinaria. Si aparecen cristales, se trata de la picrotoxina; si el residuo es resinoso, coloreado y con olor de azafrán, se trata del áloes. Si en este alcohol se vierte ácido sulfúrico y se produce un color rojo vivo, es indicio de la salicina.

Se saca el alcohol excedente y se agita el residuo con el éter anhidro, el cual se apodera del lúpulo y de la absintina. En este último caso el extracto tiene gusto á vermout, y con el ácido sulfúrico da una coloración rojo-amarilla que pasa al índigo.

Este jarabe es privado del éter por destilación, y si resulta amargo se le filtra añadiendo una solución amoniacal de nitrato de plata. Si no hay reducción, el amargo es debido á la cuasia. Si se encuentra una reducción, se evapora una parte de la disolución en una cápsula de porcelana y se añade ácido sulfúrico. Si se obtiene una coloración amarillo-gris que pasa poco á poco al violeta, es indicio del principio amargo del menianto. Si en frío no se observa cambio de color y en caliente el líquido se colorea de rojo carmín, es indicio de la genciana.

La hiel de buey se encuentra por medio de otra cantidad de cerveza de un litro evaporada aparte. Se trata el líquido evaporado en algunos centímetros cúbicos por el alcohol amílico mientras que to-

davía está caliente. Se retira el alcohol, se le evapora y se buscan las materias colorantes de la bilis por medio del ácido nítrico fumante, que da con el residuo las coloraciones que ya conocemos sucesivamente de rojo, violeta y verde.

He aquí en resumen los procedimientos prácticos más importantes para reconocer las falsificaciones de la cerveza.

CAPÍTULO IV

Análisis del aire.—Método de M. Miquel.—Método de M. Percy Frankland.—Método de M. Petri.—Procedimiento de Würtz.—Acido carbónico en el aire.—Vapor de agua en el aire.—Substancias que accidentalmente se encuentran en el aire.—Ozono del aire.—Oxígeno y nitrógeno en el aire atmosférico.

BIBLIOGRAFÍA.—Robin: *Trait. du microscop.*—Würtz: *Techn. bact.*—Henriet: *Les gaz de l'atmosphère.*—Trouessart: *Parasit. des habit. hum.*

Análisis del aire. — Entre los productos naturales que principalmente contribuyen á la vida y á la conservación de la salud, y que por consiguiente influyen por manera muy poderosa en los fenómenos de la nutrición general, se encuentra el aire, cuya importancia se funda no solamente en las proporciones de oxígeno y nitrógeno que proporciona para la vida en general, sino que importa también como medio en el cual se desarrollan multitud de microorganismos vivientes, y como vehículo de gérmenes que transportados á largas distancias por las corrientes atmosféricas, son un medio de emigración y traslación para multitud de elementos que pueden influir más ó menos directamente en la vida de los seres superiores.

Los procedimientos empleados para la determinación y numeración de los gérmenes del aire son muy numerosos, y como la exposición de todos estos procedimientos sería demasiado extensa, indicaremos solamente los más importantes, aconsejando á los que deseen más amplios detalles que consulten la notable Monografía de M. Miquel ó los trabajos de M. Petri donde se detallan la historia y trabajos relativos á este asunto.

Los métodos empleados hasta hoy pueden reducirse á dos tipos fundamentales:

1.º Se puede recoger el aire que se quiere analizar sobre un filtro (algodón de cristal, amianto, algodón ó polvos diversos).

2.º Se puede hacer que el aire esté contenido en un líquido en el cual se verifica en seguida la separación de los microbios que se depositan.

Las primeras investigaciones precisas sobre los organismos del aire son debidas á M. Pasteur que las consignó en su célebre Memoria *sobre los corpúsculos organizados que existen en la atmósfera*. M. Pasteur hacía pasar, por medio de un aspirador, el aire á través de borras de algodón nítrico. Estas borras eran en seguida disueltas en una mezcla de alcohol y de éter y al depositar daban un colodión por decantación, precipitándose los polvos atmosféricos detenidos al pasar el filtro. Este sedimento era examinado al microscopio y revelaba la presencia de esporos y de hongos.

Además, introduciendo estas borras en un caldo nutritivo debidamente esterilizado, M. Pasteur comprobó en él el desarrollo de bacterias y de mohosidades. Más tarde imaginó un método más perfecto, que consistía en hacer llegar un volumen de aire determinado hasta un cierto número de globos que contenían caldo esterilizado y cuyo pico se rompía en el momento de la experiencia. Entonces, según la proporción de globos que se enturbiaban y de los que quedaban estériles, se deducía el número de gérmenes contenidos en el aire.

Método de M. Miquel. — Este método inspirado en el de M. Pasteur, se reduce en último término á hacer borbotar á través de globos con dos tubuluras una cantidad determinada de aire. El número de los globos para cada ensayo de aire es próximamente de 30 y es importante hacer pasar á través de estos globos una cantidad de aire tal, que de la totalidad de estos globos colocados en seguida en la estufa solamente se enturbia la mitad. Se supone que cada uno de los globos enturbiados sólo ha recibido un germen, y del número de globos enturbiados se deduce el número de los gérmenes que contiene el volumen de aire que ha atravesado todos los globos.

Desde que M. Koch ha imaginado el cultivo sobre medios sólidos, se aplica al análisis bacteriológico del aire. Una cápsula de cristal que contiene gelatina esterilizada y semisólida, queda expuesta al aire durante un tiempo indeterminado, y dejando después á las colonias tiempo para desarrollarse, se las cuenta y examina. Este procedimiento, que es útil como medio de orientación, no puede servir para una determinación precisa del número de microbios del aire.

El procedimiento de M. Hesse, derivado del de M. Koch, constituye un progreso notable y consiste en hacer pasar una cantidad determinada de aire por el interior de un tubo de cristal sobre cuya pared interior se ha extendido una capa delgada de gelatina nutritiva. El aire debe pasar muy lentamente por el interior del tubo y éste debe tener una longitud suficiente para que todos los gérmenes puedan depositarse.

Método de M. Percy Frankland. — Este procedimiento está basado sobre el principio siguiente: emplear la borra como filtro é incorporar en seguida esta borra con caldo gelatinizado. El autor emplea una borra de algodón de cristal dispuesta en un tubo de ensayo que

lleva dos estrangulaciones. En este tubo y con separación de algunos centímetros se introducen dos tapones de dicho algodón y se hace la aspiración por uno de los extremos del tubo por medio de un tapón con un agujero por el cual se introduce un tubo de cristal que se enlaza con el aspirador de la trompa.

Para servirse de este aparato, que es muy cómodo, se colocan las borras filtrantes, y se ponen en los extremos del tubo dos tapones de algodón ordinario, esterilizando el conjunto en el horno Pasteur. En el momento de hacer el análisis se pone en la extremidad superior del tubo el tapón agujereado con tubo de cristal del cual hemos hablado, se enlaza el aparato con la trompa, se quita el otro tapón de algodón colocado en la parte inferior del tubo y se hace el vacío.

El autor coloca las borras cargadas de gérmenes en un globo de 100 cc. con 5 ó 10 cc. de gelatina. Con una varilla de cristal esterilizada se remueven las borras para repartir los gérmenes en la gelatina licuada que se esparce por el interior del globo.

Este procedimiento ofrece también algunas dificultades porque es difícil obtener la división completa de esta borra, y su mezcla con la gelatina forma una capa lechosa en medio de la cual es difícil distinguir las colonias de microorganismos.

Método de M. Petri. — En lugar de una borra de algodón de cristal emplea un doble filtro formado de arena fina encerrado entre dos rodajas de tela de cobre de mallas muy finas encerrando el todo en un tubo de cristal. El aire aspirado por una trompa ó una bomba de mano atraviesa el filtro de arena cediendo todos sus gérmenes. La arena con las rodajas de tela de cobre son después depositados y repartidos en pequeñas cápsulas de cristal y humedecidos con gelatina nutritiva.

Después se cuentan las colonias que se desarrollan como en los cultivos sobre placas.

En el procedimiento de M. Miquel, según hemos visto, se emplean los polvos solubles que no presentan los inconvenientes del algodón de cristal y de la arena cuando se les incorpora á la gelatina. Generalmente se usa el azúcar de caña ó mejor el sulfato de sosa anhidro. Estas dos substancias pueden ser pulverizadas y esterilizadas sin perder por esto su carácter higroscópico. Estos polvos se colocan en un tubo de cristal de 20 c. de largo, cerrado por un capuchón de cristal. El tubo está provisto en la extremidad opuesta de una estrangulación, y debajo y encima de ella se colocan dos tapones de algodón. Hácese la aspiración por la parte superior, cuidando de que el tubo esté perfectamente vertical después de haber quitado el capuchón de cristal.

Después de haber pasado el aire, se incorporan con gelatina fundida los polvos cargados de gérmenes, los cuales se disuelven y no impiden el examen ulterior de las colonias.

Procedimiento de Würtz. — Este sabio bacteriólogo emplea un aparato de su invención al cual llama de *barbotage*. Compónese de

un tubo de cristal que mide algunos centímetros de diámetro y que lleva una abertura que mide 15 milímetros de diámetro en sus dos extremidades. En este tubo se coloca la gelatina nutritiva y en el fondo del mismo se establece un segundo tubo de pequeño calibre cuya extremidad inferior está finamente afilada. En la extremidad superior lleva un ensanchamiento redondo que cierra herméticamente la abertura del tubo grueso. Este lleva lateralmente una tubulura de desprendimiento provista de una estrangulación para sostener las borras.

Para servirse de este aparato se tapa con borra el orificio superior del tubo de pequeño diámetro como también el de la tubulura de desprendimiento, y se esteriliza el aparato por el calor seco. Después de haber retirado el tubo interior, se vierten en el tubo grueso 10 cc. de gelatina líquida y se añade á esta gelatina una gota de aceite esterilizado. Esta última precaución es absolutamente indispensable porque impide el moho de la gelatina. El conjunto es esterilizado en la autoclava á 115° durante un cuarto de hora, al cabo de cuyo tiempo puede funcionar el aparato.

Durante toda la operación se sostiene todo el aparato con la mano para que el calor de ésta impida que solidifique la gelatina. Por un tubo de cauchuc se enlaza el tubo lateral con un aspirador y se quita la borra que cierra la extremidad superior del tubo de pequeño diámetro. Entonces se hace funcionar el aspirador con la velocidad que se quiera, haciendo pasar á través de la gelatina un número determinado de litros de aire. Gracias á la presencia del aceite, las burbujas formadas por el paso del aire á través del líquido son muy finas, cualquiera que sea la velocidad de este paso. De aquí resulta que se puede hacer pasar un volumen de aire muy considerable durante un tiempo relativamente corto (50 litros en un cuarto de hora). Terminada la operación, se pone nuevamente la borra en la extremidad superior del tubo, y soplando por la tubulura lateral se hace subir la gelatina al interior del tubo grueso para arrastrar los gérmenes que hayan podido quedar adheridos. Hecho esto se retira la borra de seguridad, y por medio de un hilo de platino esterilizado se empuja hacia el interior del tubo grueso la borra de la tubulura lateral. Se coloca nuevamente la borra de seguridad, se agita suavemente y diferentes veces todo el aparato para repartir en la gelatina los gérmenes que hayan podido quedar adheridos á la borra, y entonces se puede proceder de dos maneras:

1.º Según que se emplee el método de cultivos sobre placas según Koch.

2.º Si se quiere utilizar el tubo grueso á la manera de tubo de Esmarch.

En el primer caso se aspira por el tubo delgado, graduado con este fin, 2 cc. de gelatina que se extiende sobre una placa, de modo que la gelatina total da de esta manera 5 placas. Se dejan desarrollar las colonias y se procede á su numeración, como hemos indicado

en el análisis del agua. Sumando las colonias desarrolladas al cabo de 4 ó 5 días sobre las 5 placas, se tiene el número de gérmenes capaces de desarrollarse en la gelatina que contiene el volumen de aire que haya atravesado el aparato.

Para que la numeración sea absolutamente rigurosa, es preciso tener cuenta de la pequeña cantidad de gelatina que queda en el aparato, para lo cual se la deja enfriar y se cuentan las colonias que puedan aún desarrollarse en ella, añadiendo esta cifra á la que se haya obtenido de las placas.

El segundo procedimiento es más expeditivo y tiene la ventaja de poner al abrigo de toda contaminación ulterior por los gérmenes del aire. Consiste en extender la gelatina, después del paso del aire, por la cara interior del tubo grueso, haciendo que se solidifique, para lo cual se coloca el aparato horizontalmente y se le hace girar bajo un chorro de agua fría. Sin embargo, Würtz da la preferencia al método de las placas que permite mejor el examen de las colonias.

Si se quiere hacer un examen cualitativo del aire, con objeto de aislar un microbio dado, debe recomendarse el método de Frankland que permite filtrar cómodamente volúmenes de aire considerables. En tal caso se puede hacer marchar durante 8 ó 10 días, día y noche, y cerca de una sala de hospital, por ejemplo, una trompa que aspire el aire á través del tubo de Frankland.

En seguida se podrán colocar las borras en tubos que contengan un poco de agua esterilizada dejándolos estar algún tiempo á una temperatura de 0° en el hielo fundente, agitando de vez en cuando con una varilla de cristal esterilizada. Se sembrará este agua cargada de gérmenes decantándola con pipetas esterilizadas, y después la misma borra, despojada también lo posible de estos gérmenes, en tubos de gelatina que se instalarán sobre placas de Petri. Todavía se podrá, si se quiere, añadir á las aguas así cargadas de gérmenes, diversas sustancias antisépticas. La inoculación de este agua á los animales podrá en ciertas ocasiones dar resultados interesantes.

Ácido carbónico contenido en el aire. — El aire atmosférico contiene constantemente pequeñas cantidades de anhídrido carbónico producto de las combustiones vivas y lentas que se verifican en la superficie de la tierra, como putrefacciones, respiración del hombre y de los animales, etc.

Conviene en muchos casos dosificar la cantidad de este gas contenido en el aire y que ya sabemos que cuando sus proporciones exceden á la normal, asfixia y mata á los animales. Para dosificar la cantidad de ácido carbónico existente en el aire, se hace pasar un volumen de éste, previamente desecado, por tubos en U que contengan potasa cáustica. Estos tubos se pesan al principiar y terminar la operación, y su aumento de peso indica el del ácido carbónico.

La cantidad contenida normal es de 3 á 6 diezmilésimas,

existiendo más en las ciudades que en el campo. Después de las lluvias, se encuentra el aire menos cargado de ácido carbónico.

A pesar de las cantidades que de dicho gas se producen diariamente sobre la superficie de la tierra, su masa en el aire no varía de modo sensible, pues es sabido que las plantas bajo la influencia de los rayos solares asimilan el carbono y exhalan el oxígeno á la atmósfera. Durante la noche los vegetales respiran como los animales, espirando ácido carbónico; pero la cantidad que producen es menor que la que descomponen durante el día, y por consiguiente las plantas impiden la acumulación en la atmósfera del anhídrido carbónico, la cual al cabo de mucho tiempo haría imposible la vida de los animales sobre la superficie terrestre.

Vapor de agua en el aire. — El aire contiene siempre vapor de agua, y la cantidad absoluta contenida en él se mide haciendo pasar un volumen conocido á través de tubos en U que contengan sustancias higrométricas. Los tubos se pesan de antemano, y concluido el experimento, el aumento de peso indica el de agua que existe en el aire.

También importa conocer el estado higrométrico del aire, es decir, la relación en peso del vapor de agua en el aire que se considera y el que contendría si estuviese saturado á la misma temperatura. El grado higrométrico se determina con el auxilio de aparatos que se designan con el nombre de higrómetros, cuyo estudio corresponde á la física.

El aire contiene más vapor de agua en verano que en invierno y su tensión es menor á una temperatura baja. El rocío, la lluvia y la nieve proceden, como es sabido, de las relaciones entre el vapor de agua contenido en la atmósfera y la temperatura.

Substancias que accidentalmente se encuentran en el aire. — Además de los microorganismos que pueden alterar las condiciones normales del aire y que producen fermentaciones y putrefacciones más ó menos conocidas, el aire puede contener también carburos de hidrógeno, amoníaco, compuestos nitrosos, ozono, yodo, polvos minerales, etc.

En cuanto á los primeros, es bien sabido que el hidrógeno protocarbonado desprendido de los pantanos se encuentra frecuentemente en la atmósfera.

Ozono del aire. — Algunas veces se encuentra un oxígeno con propiedades distintas del ordinario, al cual se llama ozono y que consiste en un estado alotrópico del primero. Uno de los medios para producir el ozono lo dan ciertas oxidaciones lentas, como sucede cuando el oxígeno se encuentra en contacto con el fósforo.

La molécula de ozono, en vez de estar formada de dos átomos como la del oxígeno, contiene tres pero ocupando sólo dos volúmenes y absorbiendo al formarse 29'6 calorías.

El ozono se descompone lenta y espontáneamente regresando al estado de oxígeno cuya transformación es casi instantánea hacia

los 150°; por esto no se ha obtenido ozono puro y sólo se prepara mezclado en proporción más ó menos grande con el oxígeno ó con el aire.

El ozono contenido en la atmósfera puede haber sido producido en ella por la acción de la electricidad atmosférica sobre el oxígeno del aire, ó bien por las oxidaciones que se verifican en la superficie del globo.

El ozono no puede acumularse en la atmósfera porque hay en ella una porción de sustancias cuyas reacciones lo destruyen, pero el papel que desempeña parece ser notable. Encuéntrase en mayor cantidad en los campos que en las ciudades y desaparece en las grandes epidemias, ó bien porque la cantidad de miasmas contenidos en la atmósfera es muy considerable y destruye todo el ozono, ó bien porque la desaparición de éste precede á la aparición de los miasmas y permite su acumulación.

Oxígeno y nitrógeno en el aire atmosférico. — Por más que los procedimientos químicos para determinar el oxígeno y nitrógeno del aire se han conocido y detallado en las nociones más sencillas de la química elemental, tienen tal importancia en sus aplicaciones á la higiene y á la patología, que no vacilamos en terminar este capítulo con un resumen del clásico y sencillo método de Dumas y Boussingault para determinar en peso las cantidades de oxígeno y nitrógeno contenidas en el aire atmosférico. Fúndase este método en el hecho de que el cobre fija el oxígeno convirtiéndose en óxido cúprico cuando se le calienta al rojo en presencia del aire.

Al efecto, en un tubo de vidrio poco fusible y cerrado con llave por sus dos extremos, se coloca el cobre; se hace el vacío y se pesa.

Sea p el peso obtenido. Este tubo se pone en comunicación con tubos en U y bolas de Liebig que contengan sustancias apropiadas para absorber el agua y el ácido carbónico. Por el otro extremo el tubo comunica con un matraz de la capacidad de 20 litros, provisto igualmente de su llave y que ha sido pesado vacío. Supongamos su peso P .

Dispuesto así el aparato, se calienta al rojo el tubo de vidrio y después se abre lentamente la llave del mismo correspondiente á los tubos en U y luego las otras dos llaves. Desde luego, el tubo y el matraz se llenan de nitrógeno; entonces se cierran las llaves y se pesa el segundo lleno de nitrógeno; sea su peso P' . En tal caso, $P' - P$ será el peso del nitrógeno contenido en el matraz.

El que contiene el tubo se conocerá pesándole; sea p' su peso, y haciendo después en él el vacío se pesa de nuevo; sea p'' su peso: $p' - p''$ será el del nitrógeno contenido en el tubo; luego el peso total del nitrógeno será: $(P - P') + (p' - p'')$.

En cuanto al peso del oxígeno, es igual á la diferencia que hay entre el peso p'' del tubo privado de nitrógeno y que contiene el óxido de cobre, y el peso p vacío de aire y conteniendo el cobre.

Los resultados obtenidos por diferentes métodos dan cifras

absolutamente conformes. Los volúmenes de oxígeno y nitrógeno contenidos en 100 volúmenes de aire atmosférico son los siguientes:

Oxígeno	80·77
Nitrógeno	78·35

Toda alteración de estas cifras supone una alteración en las condiciones normales del aire, que debe ser cuidadosamente estudiada por el higienista y el patólogo que se preocupan por su salud y por el bienestar de los demás.



SECCIÓN SEXTA

APÉNDICES. — I.

CAPÍTULO V

Técnica bacteriológica.—Aparatos para el estudio de la bacteriología.—Aparatos para los cultivos en medios líquidos.—Matraz Pasteur.—Frasco de Erlenmayer.—Aparatos para los cultivos en medios sólidos.—Aparatos para cultivos sobre placas.—Globo-pipeta Chamberland.—Aparatos para el cultivo de microbios anaerobios.—Aparatos diversos.—Horno Pasteur.—Esterilización por el calor húmedo.

BIBLIOGRAFÍA.—Wurtz: *Techniq. bactér.*—Thoinot: *Précis de microb.*—Echesner: *Chim. org. et biol.*—Pasteur: *Mémoir.*

Técnica bacteriológica. — Después de tratar en general los asuntos capitales que entran directamente en el dominio de la Química biológica, creemos indispensable, para completar el plan que nos hemos propuesto, dedicar especialmente algunas páginas á la química de los microorganismos, ciencia que constituye hoy una de las más bellas aplicaciones del progreso científico.

Realmente la flora microorgánica pertenece aún por completo al dominio de la química, y aun no ha llegado el día, ni llegará acaso en mucho tiempo, en que la historia natural penetre de lleno en la botánica de lo infinitamente pequeño y en que la fitografía establezca series y generalice los principios de taxonomía de estos seres monocelulares.

El bacilo es aún estudiado como una célula sometida á leyes más ó menos conocidas pero relacionadas siempre con las grandes leyes generales que se estudian en el vasto conjunto de la ciencia química. He aquí la razón que obliga, cuando se trata de Química biológica, á consagrar especial atención á cuanto se refiere á la bacteriología.

Los trabajos asiduos de los sabios de Europa y América que se dedican á estas investigaciones, han hecho necesaria la creación de un arsenal copioso de instrumentos y medios de observación sin los cuales es imposible todo progreso en este género de investigaciones. Sumariamente y con la concisión que permite la índole de nuestro trabajo, vamos á dar una idea de lo más importante y práctico de este material científico y de su aplicación en el estudio de la química bacteriológica.

Aparatos para el estudio de la bacteriología. — Ocupa el primer lugar un buen microscopio cuyo conocimiento detallado corres-

pone á la Física. No es indiferente la elección del constructor, y por nuestra parte debemos recomendar el que construye M. Zeiss de Yena, bajo la dirección científica del profesor M. Abbé, cuyo microscopio es el más seguro y práctico que conocemos y cuya figura damos á continuación. (Fig. 8.^a)

Después de tener un buen microscopio, conviene disponer de los aparatos según el objeto al cual se les destine.

Aparatos para los cultivos en medios líquidos. — **Matraz Pasteur.** — Consiste este aparato en un pequeño globo de fondo plano en cristal delgado, con un tapón esmerilado de forma especial, que termina por un tubo de cristal obturado por un tapón de algodón. (Fig. 9.^a)

El matraz cónico está tapado al esmeril de igual manera que el de Pasteur, del cual sólo se diferencia por su forma cónica. (Fig. 10.)

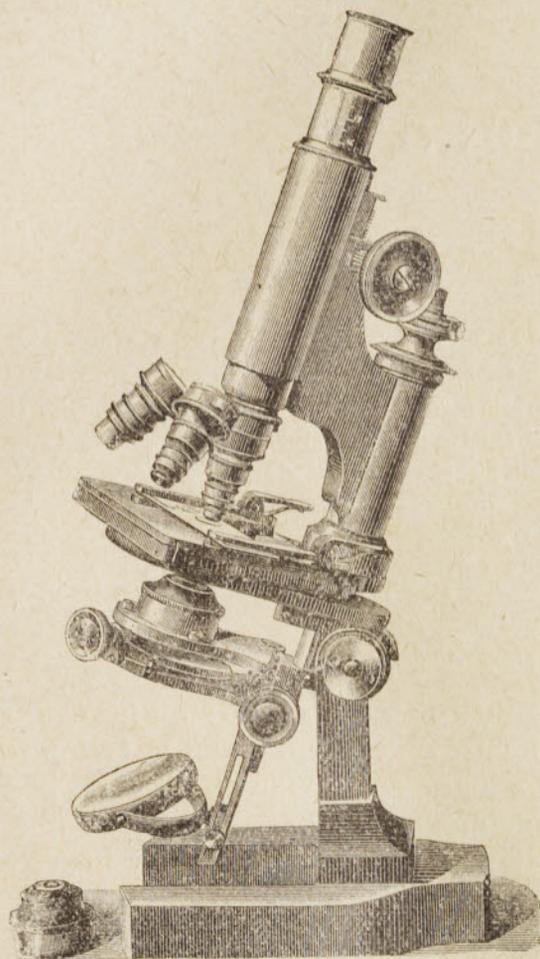


FIG. 8.^a

Microscopio de ZEISS.

También tenemos matraces muy sencillos de los que emplea nuestro sabio compatriota el Dr. Ferrán y que presentamos en las Figs. 11, 12 y 13, cuyos aparatos son tan sencillos que la simple inspección de las figuras indica el uso que puede hacerse de ellos.

Frasco de Erlenmayer. — Con este nombre se designa un frasco de forma cónica y de capacidad variable (Fig. 14), cuya simple inspección hace innecesarios los detalles.

Aparatos para los cultivos en medios sólidos. — Los tubos de ensayo deben ser elegidos del diámetro de 1 centímetro y medio á



FIG. 9.

Matraz PASTEUR, con tapón esmerilado.

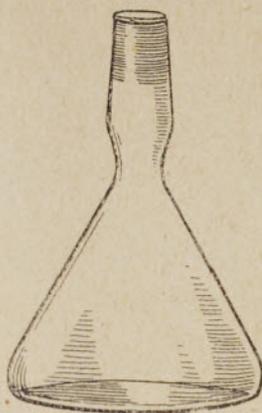


FIG. 10

Matraz cónico (PASTEUR).



2 c. (Fig. 15). En la parte superior deben terminar por bordes rectos, debiendo desecarse aquellos cuyos bordes están inclinados hacia fuera, porque esta inclinación constituye una dificultad para



FIG. 11

Matraz para cultivo, modelo J. FERRAN
manera de efectuar las siembras.



FIG. 12

Matraz para cultivos, modelo J. FERRAN.

la aplicación de capuchones en papel filtro, de la cual hablaremos más adelante.

Los tubos de ensayo han de ser lavados, secados y tapados con algodón y después esterilizados en el horno, como diremos después.

Aparatos para cultivos sobre placas. — Para los cultivos sobre placas, según el método de Koch, se toman placas de cristal rectangulares de dimensiones variables de 12 por 10 por término medio y un poco más gruesas que los portaobjetos usados en micrografía. Las placas empleadas por los fotógrafos y conocidas por el nombre de *cuarto de placa* pueden servir perfectamente. Las placas previamente lavadas y secas serán colocadas para la esterilización en una caja de chapa de hierro de 0'14 c. de largo por 0'18 de alto, según la Fig. 16.

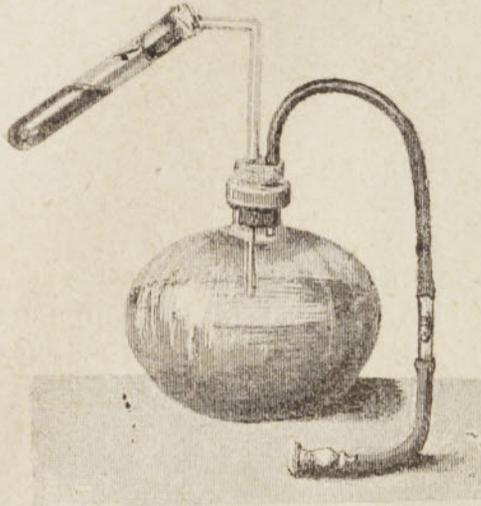


FIG. 13

Matraz de cultivo, modelo J. FERRÁN: manera de extraer líquido de cultivo.

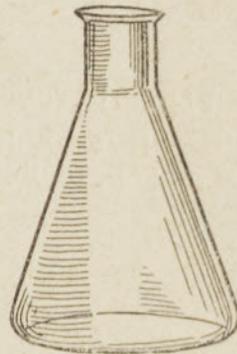


FIG. 14

Frasco de ERLÉNMEYER.



FIG. 15

Tubo de ensayo.

Las cajas de Petri, cuyo uso se va generalizando, son las representadas en las Figs. 17 y 18. Se componen esencialmente de dos placas circulares de cristal con bordes revueltos, cuyas dos placas están dispuestas de tal manera que una de ellas, de un diámetro superior, puede formar la cubierta de la otra. La caja, después de lavada y secada en la estufa, se ha de esterilizar al horno, siendo mejor hacerlo en la autoclava. A este efecto se envuelve la caja en una hoja de papel filtro que se sujeta con un hilo. La caja no debe ser privada de esta envoltura de papel sino en el momento de usarla.

Globo-pipeta Chamberland. — Este globo (Fig. 19) lleva en su parte superior un ligero ensanchamiento que se prolonga por un tubo inclinado de 45°. Este tubo, abierto por su extremidad superior, lleva una ó dos estrangulaciones destinadas á sostener el tapón de algodón.

En la parte esférica del globo está soldado un tubo más fino que el tubo superior, doblemente encorvado, y que termina adelgazándose. Para usarlo se lava cuidadosamente el globo-pipeta, se guar-

neces el tubo superior con un tapón de algodón que se empuja hasta la estrangulación, se cierra á la lámpara la extremidad del tubo lateral y se lleva el globo así preparado al horno de esterilización. Estos tubos-pipetas están destinados, como diremos más adelante, á conservar los líquidos de cultivo esterilizados hasta el momento de su transvasación al matraz de cultivo.

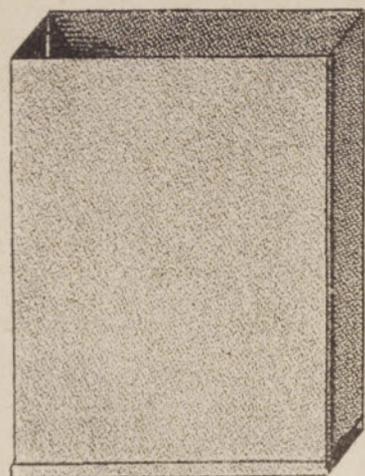
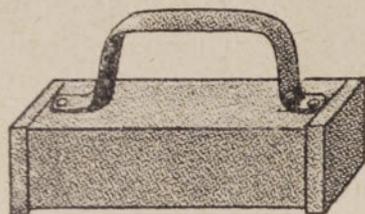


FIG. 16

Caja para esterilizar placas.

Aparatos para el cultivo de microbios anaerobios. — El tubo doble de Pasteur se empleó antes por MM. Pasteur, Joubert y Chamberland para cul-

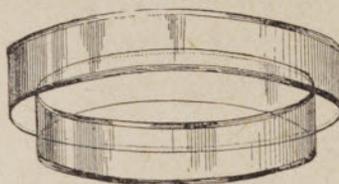


FIG. 17

Caja de PETRI, modificada.

tivar el vibrión séptico, y consiste en un tubo de dos ramas al cual está soldado un tubo de cristal estrangulado en *a*. Cada una de las ramas lleva un

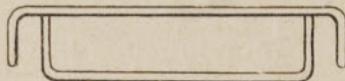


FIG. 18

Corte vertical de la figura anterior.

segundo tubo *b* de menor diámetro, como se ve en la Figura 20.

Para poner en estado de servir este tubo, se le lava cuidadosamente, se seca y se guarnece el tubo superior con un tapón de algodón que se empuja hasta la estrangulación *a*, cerrando á la lámpara los tubos laterales afilados. En tal caso sólo falta esterilizar el aparato en el horno.

El tubo simple de Pasteur es sencillamente un tubo estrangulado en un punto *a* y guarnecido lateralmente de un tubo recurvo y afilado *b*. (Fig. 21.)

Los tubos para cultivos de anaerobios en la gelatina están representados por la Fig. 22, y consisten en un tubo de ensayo que lleva en su parte superior una tubulura *b* y una estrangulación en su parte superior *a*.

El tubo para el cultivo en placas de anaerobios consiste en un tubo *a* de 25 á 30 centímetros de largo y de un diámetro de 3 centímetros que lleva en cada una de sus extremidades un tubo *b* *b'* de pequeño diámetro. Estos tubos *b* y *b'* se encorvan en ángulo recto

y están cerrados en su extremidad por un tapón de algodón. (Figura 23.)

Aparatos diversos. — Las pipetas Pasteur, representadas en las Figs. 24 y 25, se preparan con una gran facilidad y son de grande aplicación práctica en la bacteriología.

Al efecto, se toma un tubo de cristal de 5 á 6 milímetros de diámetro, poco grueso y de 1'20 metros próximamente de longitud. Este tubo se limpia cuidadosamente y se le corta por medio de una lima en 4 fragmentos de 30 centímetros próximamente, en cuyo caso se tienen cuatro pequeños tubos rectos.



FIG. 19

Matraz-pipeta de CHAMBERLAND.

Tómase uno de estos tubos y se le calienta en la llama del soplete de gas en su parte media imprimiéndole entre los dedos un movimiento de rotación rápida. Cuando el cristal entra en fusión, se separa de la llama y se estira lentamente para obtener un largo estrechamiento. De esta manera se tienen dos pipetas terminadas por una extremidad capilar que se cierra inmediatamente á la llama.

Entonces se redondean al soplete los bordes de la extremidad gruesa no afilada y se guarnece esta extremidad en *a* con un tapón de algodón.

A este efecto se toma una pequeña porción de algodón y por medio de una varilla se la introduce en la pipeta con una ligera presión.

De igual manera se prepara cada uno de los otros pequeños tubos rectos haciendo dos pipetas de cada uno de ellos, debiéndose construir gran número de aquéllas porque es indispensable tener siempre á disposición cierta cantidad de estos pequeños instrumentos. Terminadas las pipetas, se las colocará para esterilizarlas en el horno del cual hablaremos más tarde.

Horno de Pasteur. — La esterilización es una operación capital en bacteriología, porque ella sola puede asegurar la pureza de los cultivos. Esta operación puede realizarse de tres maneras diferentes:

- 1.º Por calor seco,
- 2.º Por calor húmedo,
- 3.º Por filtración.

La esterilización por calor seco puede efectuarse de la manera más sencilla pasando por la llama de un mechero de gas el objeto que se desea esterilizar. De esta manera se opera generalmente con las pipetas de cristal, los hilos de platino y aun con los instrumentos de acero.

Pero la esterilización por el calor seco puede efectuarse más metódicamente por medio del horno de Pasteur. El empleo de este horno sólo puede aplicarse á los objetos de cristal y á ciertos instrumentos inalterables por el calor; todo recipiente que contenga una substancia evaporable, no puede ser esterilizado con este aparato.



FIG. 20

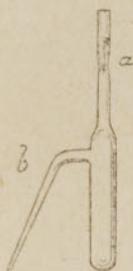


FIG. 21

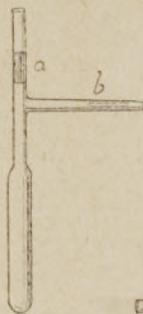


FIG. 22



FIG. 23

20, Tubo doble de PASTEUR. (Cultivo de anaerobios.) — 21, Tubo simple de PASTEUR (Anaerobios).
22, Tubo para cultivo de anaerobios sobre gelatina. — 23, Tubo para cultivo de anaerobios en placas.

El horno Pasteur (Fig. 26) es un aparato de chapa de hierro, con pared doble, con retorno de la llama, y con hornillo de gas en la parte inferior y chimenea central.

Sus dimensiones son variables y está terminado en su parte superior por una tapadera con un agujero en el cual se hace penetrar un tapón atravesado por un termómetro.

En el interior del horno se depositan los objetos que se hayan de esterilizar, de modo que la extremidad de dichos objetos que lleve tapón de algodón esté hacia arriba, disponiéndolos sobre una rejilla de tela metálica que es colocada en la cámara del horno.

Cuando la rejilla cargada con los objetos que se han de esterilizar está colocada en su puesto, se adapta la tapadera al aparato, se coloca el tapón que lleva el termómetro, se enciende el gas y se deja subir la temperatura á 170° ó 180°.

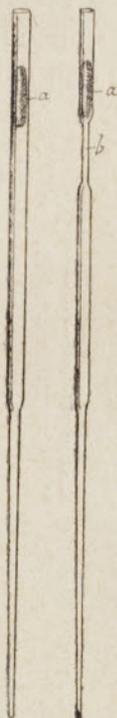
Entonces se regula la temperatura por tanteo cerrando ó abriendo la llave del gas de modo que se obtenga una temperatura media de 170° que se mantiene durante una hora y media ó dos horas. Pasado este tiempo, se apaga el gas, se deja bajar el termómetro y se

retira la rejilla metálica con los objetos que contenga. El algodón que obtura los vasos debe quedar tostado, pero no carbonizado; todo recipiente cuyo algodón esté carbonizado no es utilizable.

En el uso de este aparato deben recomendarse tres precauciones:

1.º Presentar una cerilla, papel, etc., encendidos en los mecheros del gas antes de abrir la llave de entrada de dicho gas.

2.º En los objetos cerrados con algodón se ha de disponer la extremidad guarnecida con el tapón de algodón hacia arriba y lo más lejos posible del fondo del horno.



FIGS. 24 y 25

Pipetas PASTEUR.

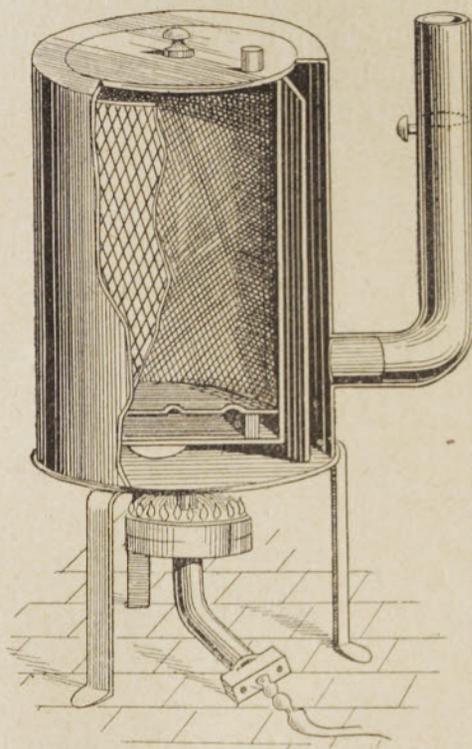


FIG. 26

Horno de PASTEUR para esterilizar los instrumentos de cristal.

3.º Al terminar la operación se ha de dejar que los objetos se enfrien dentro del horno, pues si se retiran cuando aun están calientes, hay peligro de que se rompan en contacto con el agua ó el aire fríos.

Esterilización por el calor húmedo. — El aparato que generalmente se emplea con este fin es la autoclava de Chamberland. (Fig. 27.)

Consiste este aparato en una marmita de Papin provista de una llave, de una válvula de seguridad y de un manómetro que indica la presión y, por consiguiente, la temperatura, teniendo en cuenta que:

0	atmósferas	corresponden	á	100°
1	»	»	á	110°
2	»	»	á	134°

Los objetos que se han de esterilizar se colocan dentro de un cesto de hilo metálico.

La obturación completa entre la marmita y su tapadera se obtiene por un círculo de caucho. Dos índices colocados el uno sobre el corte de la tapadera y el otro sobre la parte superior de la marmita, deben coincidir cuando se cierra la autoclava; cuando se descuida esta precaución, los tornillos con sus tuercas no entran exactamente en los orificios correspondientes y el aparato no cierra herméticamente.

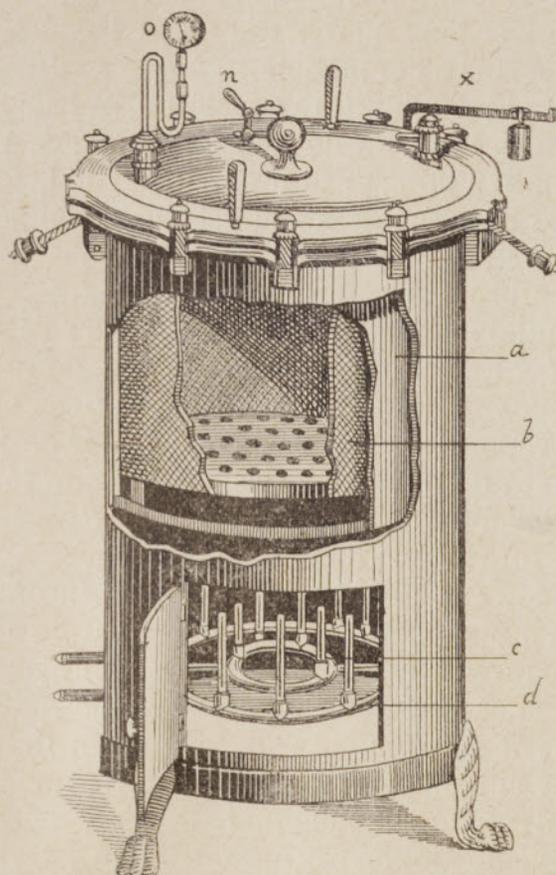


FIG. 27

Autoclava de CHAMBERLAND.

Para servirse de la autoclava hay que asegurarse primero si el fondo del aparato está lleno de agua, siendo suficiente que ésta ocupe una altura de 10 centímetros para una larga esterilización, en cuyo caso no necesita ni mucho gas ni mucho tiempo para calentarse.

Se colocan los objetos que se han de esterilizar tapados con algodón en el cesto de cobre, se cierra la tapadera y se enciende el gas con las precauciones que hemos indicado al tratar del horno Pasteur.

Después de encendido el gas es preciso dejar abierta la llave co-

locada sobre la tapadera hasta que salga un chorro de vapor continuo por este orificio, y la razón es porque el manómetro está graduado según las tablas de Regnault, que dan las relaciones entre la temperatura del vapor de agua y la fuerza elástica. Si no se ha privado de aire el aparato, este aire, dilatado por el calor, obraría al mismo tiempo que el vapor de agua haciendo girar la aguja, y la temperatura dada por la lectura del manómetro sería muy superior á la de la mezcla de aire y de vapor de agua contenidos en la autoclava.

Cuando se tiene la seguridad de que el aparato no contiene aire, se cierra la llave y se deja marchar la aguja hasta el grado de temperatura marcada sobre el manómetro á que se desee llegar.

Para mantener la temperatura constante, se baja la llama del gas hasta que su altura sea sólo de uno ó dos dedos, y tanteando un poco se llega pronto á obtener la inmovilidad de la aguja del manómetro. El tiempo necesario para la esterilización sólo se cuenta á partir de este momento, es decir, cuando la presión y, por consiguiente, la temperatura llegan á ser constantes.

Pasado el tiempo necesario, se apaga el gas y se deja que la presión baje á 0°. Hay que evitar, sobre todo cuando se esterilizan tubos ó globos llenos de líquidos hasta los bordes, el dejar escapar bruscamente el vapor abriendo la llave después de apagado el gas, porque hay peligro de que al bajar bruscamente la presión salten los taponos de algodón que cubren los globos ó los tubos y que, por consiguiente, se inutilice la operación.

Cuando se opera con la autoclava es indispensable no perder de vista la aguja del manómetro. Cuando el aparato está en presión conviene no separarse de él porque puede sobrevenir un aumento en la presión del gas que determinaría una elevación súbita de la temperatura, y por consiguiente de la presión del vapor de agua contenido en la autoclava, á lo cual seguiría una explosión de la marmita si la válvula funcionaba mal.

También se puede emplear como medio de esterilización húmeda la simple ebullición del agua, como se hace frecuentemente en la práctica para desinfectar, por ejemplo, los instrumentos como escalpelos, pinzas, tijeras, etc., que han servido en una autopsia, siendo suficiente en tal caso hacerlos hervir durante un cuarto de hora en el agua contenida en una marmita ordinaria de hierro.
