

CAPÍTULO VI

Esterilización por filtración. — Medios de cultivo. — Caldos — Caldo simple. — Caldo peptonizado. — Leche como medio líquido de cultivo. — Orina como medio líquido de cultivo. — Humor acuoso como medio líquido de cultivo. — Suero. — Agua de levadura. — Medios sólidos de cultivo. — Gelatina. — Gelosa. — Gelatina-gelosa. — Suero como medio sólido de cultivo. — Patatas como medio sólido de cultivo. — Estufa de incubación. — Inoculaciones. — Materias de inoculación. — Procedimientos de inoculación. — Inoculaciones superficiales. — Inoculaciones subcutáneas. — Inoculaciones intraperitoneales. — Inoculación en el pulmón. — Inoculación en la cámara anterior del ojo. — Inoculación intravenosa.

BIBLIOGRAFÍA. — Joergensen: *Les Microorg.* — Thoinot: *Préc. de microb.* — Wurtz: *Techniq. bactériol.* — Mariani: *Fitoparasitismo.* — Klein: *Microb.*

Esterilización por filtración. — En técnica microbiológica filtrar un líquido es privarle por filtración de todo germen que pueda contener. Este método sólo puede emplearse para líquidos no viscosos, pues se sabe con cuánta dificultad pasan á través de los filtros de papel los líquidos que contienen aún en pequeña proporción materias albuminoides, cuya dificultad aun sería mayor filtrando estos líquidos á través de filtros de porcelana.

Por consiguiente, sólo deberán emplearse los filtros para líquidos que contengan solamente pequeñas cantidades de materias albuminoides, como los caldos.

Varios modelos se han imaginado con este fin, y M. Pasteur, que fué el primero, hacía sus filtros en yeso. Al mismo tiempo A. Gautier empleaba sus filtros de bizcocho de porcelana, lo cual fué un gran progreso, pues entre otras ventajas poseía la de poder ser lavados perfectamente estos filtros, despojándolos así de los gérmenes depositados en su superficie. Este autor filtraba por aspiración, valiéndose de una trompa, siendo éste el procedimiento que con algunas modificaciones ha prevalecido hasta el día.

Los filtros comúnmente generalizados tienen la forma de la bujía de Chamberland.

Este filtro, representado en la Fig. 28, en corte y en su aspecto normal, debe ser ensayado en el laboratorio antes de ponerlo en

uso. La operación es muy sencilla y consiste en adaptar la extremidad cónica de la bujía al tubo de un pulverizador. Se introduce la bujía en el agua y se hace funcionar dicho pulverizador. Si se forman burbujas de aire en el líquido, la bujía está rota y debe ser desechada.



FIG. 28
Bujía CHAMBERLAND normal.
Sección vertical.

Hay diversos aparatos de filtración por medio de la bujía Chamberland. El mejor, sin duda, es el imaginado por el mismo Chamberland, representado en la Fig. 29.

Compónese de tres piezas, relacionadas las unas con las otras. Una de éstas es la bomba aspirante *s* puesta en comunicación con la parte superior del aparato por medio del tubo metálico *o*. La segunda pieza es el recipiente metálico *n* que presenta dos orificios: el superior es ancho y el inferior de pequeño diámetro, llevando una especie de canal provisto de una llave que termina el depósito en su parte inferior.

El orificio superior está cerrado por una fuerte chapa de cobre, estando asegurada la obturación por tornillos y por un círculo grueso de cauchuc que rodea el agujero.

La placa superior lleva tres agujeros que comunican con el interior del depósito. Uno de dichos orificios comunica con un manómetro; el segundo con el tubo de la bomba, y otro con una llave y está destinado á dejar paso al líquido que se introduzca en el aparato.

La última parte del aparato consiste en un cilindro metálico hueco, colocado en la parte inferior y destinado á sostener la bujía.

Esta bujía no llena exactamente la cavidad del cilindro, sino que deja en su parte superior y al rededor de ella un espacio vacío. Cuando está colocada en su puesto, debe cerrar completamente el orificio de la extremidad inferior.

Para darse cuenta detallada del mecanismo y manera de funcionar el aparato, acompañamos un corte vertical del mismo (Fig. 30), cuya simple inspección nos dispensa de más explicaciones.

La marcha general de la operación con este aparato es la siguiente:

Dispuesto de la manera que hemos dicho, se introduce el líquido que se ha de filtrar en la capacidad superior, se cierra el orificio por donde éste ha entrado y se hace funcionar la bomba. El líquido contenido en toda la cavidad cerrada y al rededor de la bujía, penetrará bajo la presión por el único camino que le queda abierto, los poros de la bujía, pasando á la cavidad de ésta y saliendo por su parte inferior.

En las operaciones de filtración de los cultivos se han de emplear minuciosas precauciones de asepsia, de modo que el líquido no contenga ni un solo germen al salir del aparato.

Estos principios son:

- 1.º Filtrar con una bujía esterilizada.
- 2.º Esterilizar todas las vías de conducción del líquido filtrado.
- 3.º Recibir el producto de la filtración en un vaso estéril.

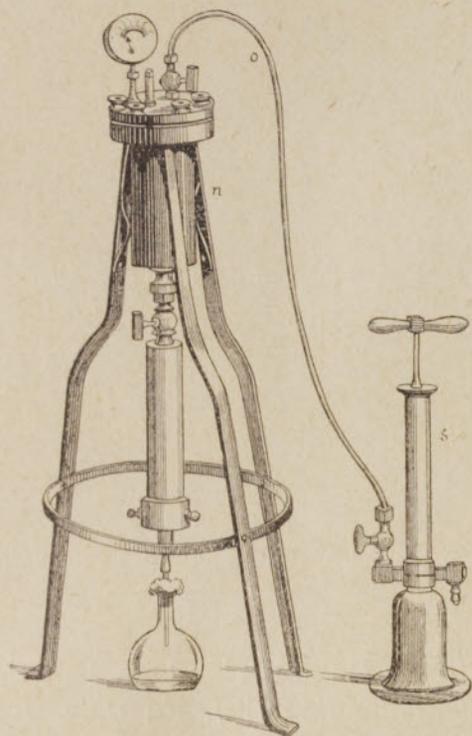


FIG. 29

Aparato CHAMBERLAND (para filtrar)

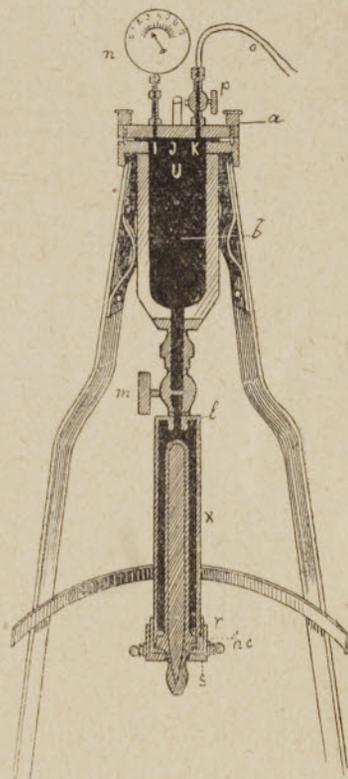


FIG. 30

Sección del aparato de filtración de CHAMBERLAND.

Para conseguir esto se toma una bujía que se encuentre en buen estado y perfectamente seca; adaptando en su parte inferior un tubo de cauchuc que por una parte ajusta á la bujía y por otra con un pequeño tubo de cristal afilado y cerrado á la lámpara, como representa la Fig. 31. Este pequeño aparato se lleva á la autoclava, envolviéndolo en una hoja de papel filtro y esterilizando á 120° durante 15 minutos. Retirase después de la autoclava y con una lima se hace una señal sobre la extremidad afilada, colocando la bujía así dispuesta en el aparato de filtrar.

Después se toma un globo esterilizado y tapado con algodón, se calienta á la llama la extremidad afilada de la bujía, se rompe dicha extremidad, se quita el algodón que tapaba el globo y se introduce dicha punta en el orificio del globo que se acaba de cerrar con

algodón esterilizado. Entonces se vierte el líquido que se ha de filtrar en el recipiente del aparato de filtración y se da principio á ésta en la forma que hemos indicado.

Terminada la operación se retira el vaso que contiene el líquido y se coloca en la estufa á 37°. Si la operación ha sido bien hecha, el líquido quedará perfectamente claro.

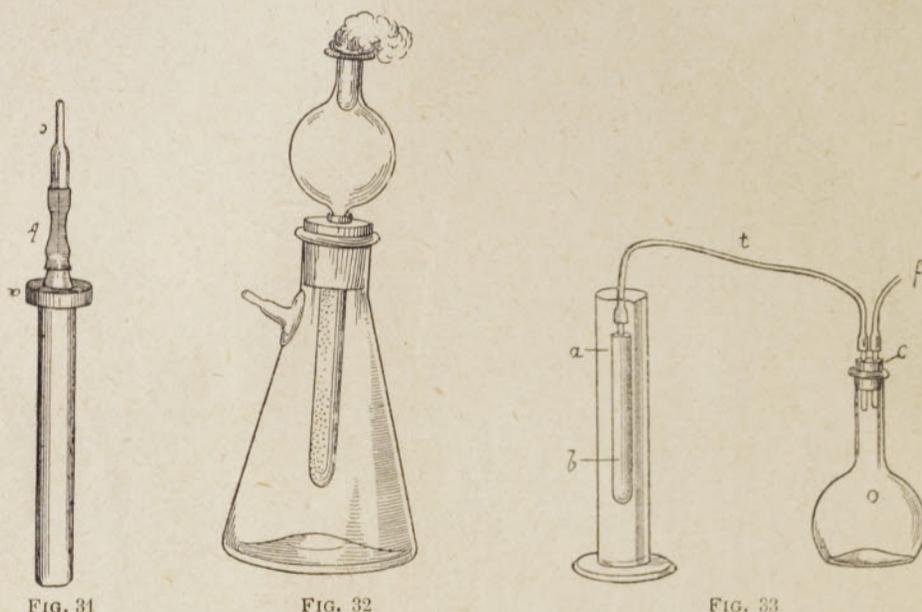


FIG. 31

Detalle del aparato de filtración.

FIG. 32

Garrafa-filtro de KITASATO

FIG. 33

Aparato de filtración en el vacío

Método de Kitasato. — El aparato de Chamberland es bastante caro, si bien es el que da más seguridades de éxito. En defecto de éste puede emplearse el procedimiento empleado por Kitasato y que también da excelentes resultados. El aparato llamado garrafa para filtrar y representado en la Fig. 32, consiste en una capacidad de forma cónica truncada y de paredes gruesas, que lleva un ancho orificio en su parte superior y otro de menor diámetro provisto de una tubulura en su pared lateral.

El orificio superior va provisto de un tapón de cauchuc que soporta la bujía, y el orificio lateral se pone en comunicación con la máquina para hacer el vacío.

La bujía que se emplea en este caso es de la forma y dimensiones de un tubo de ensayo de medianas dimensiones. La parte abierta de la bujía está vuelta hacia arriba y á ella se adapta un embudo de forma esférica, como se ve en dicha figura, el cual contiene el líquido que se ha de filtrar.

La marcha de la operación con este aparato es muy sencilla; colocado el líquido en la capacidad superior, se enlaza la tubulura lateral con una máquina cualquiera para hacer el vacío, y hecho éste el líquido penetrará en el cuerpo de la bujía, atravesará sus poros

y caerá en el interior del recipiente. La filtración por este procedimiento es sencilla y el aparato poco costoso, pero la operación es larga.

Aun se puede con una bujía de modelo ordinario, una probeta y un vaso de paredes resistentes construir de momento un aparato de filtración muy sencillo y suficiente casi siempre á las necesidades de laboratorio. La Fig. 33 representa este aparato cuyo funcionamiento es muy sencillo.

La bujía *b* está colocada en el líquido que se ha de filtrar y que está contenido en la probeta *a*. La extremidad abierta de la bujía se encuentra en la parte superior y por el tubo *t* se relaciona con uno de los tubos que atraviesa el tapón *c* que cierra á frotamiento el matraz *o*. El otro orificio de este tapón lleva un tubo *f* que se relaciona con una maquina de vacío.

La manera de funcionar el aparato es la siguiente: hecho el vacío en el matraz, el líquido contenido en la probeta atraviesa los poros de la bujía bajo la influencia de la presión atmosférica y viene á depositarse en el matraz.

Medios de cultivo. — La técnica microbiológica admite hoy dos especies de medios de cultivo:

- 1.º Cultivos en medios líquidos.
- 2.º Cultivos en medios sólidos.

Los líquidos de cultivo son muy variados. Los principales que se emplean son:

- a*). Caldos de carnes.
- b*). Líquidos orgánicos naturales, leche, humor acuoso, suero, etc.
- c*). Preparaciones artificiales complejas como los líquidos de Raulin, de Cohn, etc.
- d*). Agua de levadura, de malta, etc.

Caldos. — Los caldos de carne pueden ser simples ó sea sin añadir otra substancia que algunos gramos de sal marina ó peptonizados. También pueden ser peptonizados y glicerinados, ó peptonizados, glicerinados y glucosados, cuando además de la peptona se añade una cierta cantidad de glucosa y de glicerina.

Caldo simple. — Puede emplearse la carne de buey, de caballo, de asno, de mulo, de ternera, de carnero, de cerdo, de conejo, de gallina, etc.

Se toman 500 gramos de la carne elegida, se le quitan los huesos, la grasa, los tendones y las aponeuroses, y se la pica finamente. Estos 500 gramos de carne se ponen en un recipiente que contenga 1000 gramos de agua destilada y con una espátula de porcelana se mezcla la carne con el agua, dejándola macerar en frío durante 24 horas.

Si se quiere ganar tiempo, se puede hacer la maceración en caliente, poniendo 500 gramos de carne en 1000 gramos de agua destilada y á la temperatura de 50º, dejándola macerar á esta tem-

peratura en la autoclava durante media hora próximamente y no debiendo pasar de dicha temperatura, porque entonces se coagularía la albúmina y retendría cierta cantidad de materias solubles.

Cualquiera que sea el medio de maceración empleado, se filtra el líquido sobre un lienzo mojado y se obtiene cierta cantidad de un caldo ligeramente rojizo. Pésase este caldo y se añade tantos gramos de agua destilada como sea suficiente para que el peso del caldo llegue á un peso doble del de la carne empleada, y se añade un $\frac{1}{2}$ por 100 de sal marina.

Colócase después el caldo así preparado en una capacidad perfectamente limpia, de porcelana, y se lleva este vaso á la autoclava, elevando la temperatura hasta 115° , durante 20 ó 30 minutos.

Apágase el foco del aparato, y cuando la temperatura baja á 100° se filtra sobre papel. El caldo que resulta de estas operaciones debe enrojecer más ó menos el tornasol azul, pues la reacción de la carne de buena calidad es ácida é impropia por consiguiente para un medio de cultivo. Hay, por tanto, que alcalinizar el caldo.

Al efecto, el caldo neutro ó alcalino se lleva otra vez á la autoclava y se le somete á la temperatura de 115° durante 15 minutos. Se filtra sobre papel y se recibe el líquido en un vaso de un litro previamente esterilizado. Cuando el vaso está lleno, se le tapa con algodón, y sobre este tapón se pone un capuchón de papel que se asegura por medio de un hilo.

Nuevamente se vuelve el recipiente á la autoclava y se esteriliza á 115° durante un cuarto de hora. Al salir de la autoclava el líquido es alguna vez turbio, en cuyo caso un reposo de 24 horas bastará para que quede claro.

Después de todas estas operaciones, el caldo está perfectamente esterilizado y se le conserva en el recipiente ó se le decanta en los matraces de cultivo, como diremos más adelante.

Caldo peptonizado. — El caldo simple se usa menos que el caldo peptonizado, siendo este último el que constituye el tipo clásico del medio líquido de cultivo. Prepárase en todo, [según dejamos indicado, sino que al poner en el caldo el medio por 100 de sal marina, se añade también el 1 por 100 de peptona.

Leche como medio líquido de cultivo. — El procedimiento general para emplear la leche como medio natural de cultivo es el siguiente:

Se toma una cierta cantidad de leche buena que dé reacción alcalina introduciéndola en un matraz previamente esterilizado; se la lleva á la autoclava y se esteriliza á 115° durante un cuarto de hora dejándola reposar enseguida. Por enfriamiento las partes grasas suben á la superficie del líquido, el cual se recoge por medio de una pipeta teniendo cuidado de no tomar la grasa. Para esto basta sumergir el pico de la pipeta hasta el fondo del líquido y no aspirar más cuando sólo queda una pequeña capa de éste debajo de la capa grasienta superficial. Enseguida se distribuye la leche en matraces

Pasteur ó en cualquier otro recipiente de cultivo. Estos matracas, llenos hasta su cuarta parte, se colocan en la estufa á 37°, y después de 24 á 48 horas se les examina, abandonando aquellos en que la leche se haya coagulado ó esté cubierta de mohosidades.

Los demás matraces, antes de servirse de ellos para el cultivo, se examinan al microscopio para asegurarse que no contienen microbios.

Orina como medio líquido de cultivo. — La orina no se emplea mucho en la técnica de los cultivos. Es sabido que en este medio de cultivo hizo Pasteur sus estudios sobre la bacteridia del carbunco.

Se recoge la orina, se la filtra sobre papel, se la alcaliniza y se la esteriliza como un caldo. Se la deja reposar y se la aspira por medio de una pipeta distribuyéndola con precaución en los matraces de cultivo. Estos matraces son sometidos á la estufa á la temperatura de 37° durante 48 horas, siendo desechado todo matraz cuyo líquido resulte turbio.

Humor acuoso como medio líquido de cultivo. — Para obtenerlo se sacan los ojos de un animal recientemente sacrificado, y con una varilla de cristal esterilizada y caliente á la lámpara de alcohol se cauteriza la córnea del ojo extirpado. Tómase una pipeta Pasteur esterilizada y con ella se punciona la córnea. El humor acuoso se eleva en la cavidad de la pipeta y entonces se retira ésta y se cierra su extremidad á la llama. De esta manera se tendrá una cierta cantidad de humor acuoso puro y dispuesto para ser empleado.

Suero. — Ya estudiaremos más adelante en detalle la manera de recoger el suero y de servirse de él como medio sólido, pero el suero en estado líquido puede en algunos casos ser empleado como medio de cultivo. Se empleará á este efecto el suero repartido en los tubos de ensayo, como diremos más adelante.

Agua de levadura. — En 1000 gramos de agua se ponen 100 gramos de levadura, diluyendo lentamente hasta hacer un líquido lechoso. Se lleva el recipiente á la autoclava ó al baño maría y se le hace hervir. Después de la ebullición se comprueba la reacción, que ordinariamente es ácida, en cuyo caso se alcaliniza con una solución de sosa. Se filtra y se recibe el líquido en un vaso esterilizado y se lleva á la autoclava, donde se deja á 115° durante un cuarto de hora. Después se reparte en matraces de cultivo por medio de una pipeta y siguiendo todos los detalles indicados para los caldos.

Medios sólidos de cultivo. — Estos medios son *gelatina* y *gelosa*, medios transparentes; *suero gelatinizado*, medio semitransparente, y diversos medios opacos cuyo tipo más perfecto es la *patata*.

Gelatina. — El tipo de la gelatina de cultivo es la gelatina-peptona, es decir, añadida con peptona. Para prepararla se toman 500 gramos de caldo peptonizado, neutro ó ligeramente alcalino, preparado previamente y esterilizado, evitando recoger el depósito si lo hay. Colócase este líquido en un recipiente, una cápsula de porce-

lana, por ejemplo, y se añade un 10 por 100 de gelatina cortándola en pequeños pedazos que se lavan en agua destilada.

Calientase en el baño maría á 100° y se remueve constantemente esta mezcla hasta que la gelatina quede totalmente fundida, lo cual se consigue en unos 10 minutos.

La reacción de este líquido debe ser neutra ó ligeramente alcalina; en caso contrario, se añade la solución de carbonato de sosa hasta obtener una perfecta neutralización ó ligera alcalinidad, en cuyo caso solamente se prolongará la ebullición durante 10 minutos.

Filtrase sobre papel pasando la gelatina clara y muy rápidamente. La filtración en caliente hace la operación más fácil y el producto filtrado es repartido enseguida y mientras que permanece líquido en tubos de ensayo esterilizados. Esta operación se hace por medio de un pequeño embudo, teniendo cuidado de no dejar caer la gelatina sobre la parte superior del tubo destinado á contener el tapón de algodón, pues sin tal precaución el tapón se adheriría al cristal después del enfriamiento. Cada tubo se llena hasta su tercio inferior.

Después se colocan tapones de algodón que se recubren con un capuchón de papel, se someten los tubos á la autoclava á 150° durante un cuarto de hora, se les retira, y cierto número de ellos destinados á los cultivos se coloca sobre un plano inclinado, dejando los otros en posición vertical. Por el enfriamiento la gelatina se solidifica y queda dispuesta para la siembra.

Gelosa. — Para preparar la gelosa se toma un litro de caldo al cual se añade 12 gramos de gelosa haciéndola fundir al baño maría como se ha hecho con la gelatina. Se la deja enfriar á 50° y se añaden dos claras de huevo bien batidas. La reacción debe ser ligeramente alcalina como la del caldo en que se haya fundido la gelosa. Se calienta durante un momento á 125° y se filtra en papel empleando un embudo grande. La gelosa filtrada se deposita en tubos empleando un pequeño embudo.

Una vez llenos éstos, se les esteriliza durante 15 minutos á 115° y después se les coloca de modo que la superficie del producto sea muy inclinada, para lo cual basta colocarlos sobre una mesa con su extremidad provista de algodón un poco levantada por un listón de madera.

Gelatina-gelosa. — En el verano es conveniente sustituir á la gelatina que se licua fácilmente, con un medio compuesto de gelatina y gelosa más sólido y que se licua menos fácilmente.

Para obtenerlas se añade á la gelatina un medio por 100 de gelosa y se cuida de que el líquido no resulte ácido.

Suero como medio sólido de cultivo. — Se le prepara gelatinizando por el calor el suero de la sangre de buey, de ternera, de caballo, de carnero ó de perro. Los mejores sueros son los de carnero, de buey ó de caballo.

Para prepararlo en tubos es necesario ir personalmente á recoger la sangre en el matadero cuando sale de las venas del animal, observando la más completa limpieza.

La sangre se recoge en cajas de Koch, que son cristalizadores de vidrio de la capacidad de 2 litros próximamente y que llevan su correspondiente tapadera. Estas cajas deben ser previamente esterilizadas en la autoclava ó en el horno de Pasteur.

Llenos los cristalizadores, se les lleva sin removerlos mucho á un sitio fresco y se les abandona al reposo durante 24 á 36 horas. Al cabo de este tiempo el coágulo se contrae y ocupa el centro del cristizador y puede recogerse el suero por medio de una pipeta, después de lo cual se repite la misma operación con cuantas sean necesarias.

Estas pipetas llenas de suero se colocan en un sitio fresco y se dejan en reposo por lo menos 12 horas, de modo que si quedaban en el líquido algunos glóbulos rojos en suspensión, se depositen en el fondo del vaso.

Estas series de manipulaciones dan un suero transparente, color amarillo de limón, que se puede conservar en las pipetas todo el tiempo que se quiera ó que se distribuye inmediatamente en los tubos de ensayo.

Para esta operación se toman tubos de ensayo esterilizados y tapados, los cuales se colocan sobre una mesa. Se rompe la extremidad de la afiladura de la pipeta y se esteriliza dicha extremidad sobre la llama de la lámpara de alcohol. Tómase con la mano izquierda un tubo de ensayo, se apoya sólidamente esta mano sobre el borde de la mesa y se da al tubo una dirección casi horizontal. El tubo y la mano deben quedar inmóviles durante toda esta operación, porque cualquier movimiento inoportuno haría penetrar el aire en el tubo y con el aire los gérmenes que infectarían el suero. Se pasa nuevamente la extremidad de la pipeta por la llama y con la mano derecha se quita el tapón de algodón del tubo de ensayo.

Entonces se introduce la afiladura de la pipeta en el tercio superior del tubo, soplando por la tubulura superior de aquélla y llenando la cuarta parte del tubo. No se debe pasar de esta altura, pues una capa de suero demasiado gruesa se gelatinizaría difícilmente. Hecho esto, se retira la pipeta sin tocar á la pared del tubo y se tapa éste con un tapón de algodón, repitiendo con cada tubo la misma operación.

Si quedan algunas dudas sobre la pureza de las manipulaciones, es fácil ponerse al abrigo de todo peligro sometiendo los tubos llenos de suero á la estufa y á la temperatura de 37° durante 24 ó 48 horas y desechando después de esta prueba todo tubo cuyo líquido se enturbie.

El suero así distribuido debe ser gelatinizado.

Esta operación consiste en hacer solidificar el suero bajo la acción de una temperatura conveniente, que es la de 65°. La solidifi-

cación debe operarse estando el tubo casi horizontal y de manera que el suero sólido presente una superficie oblicua al permanecer en el tubo.

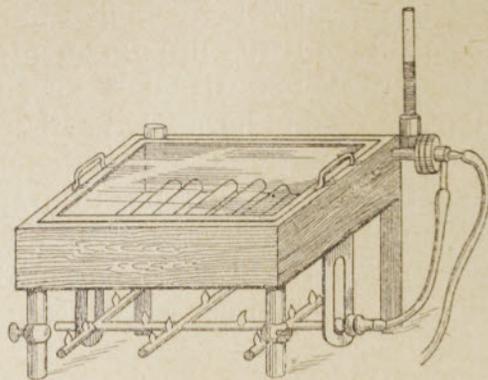


FIG. 34

Aparato de Koch para gelatinizar el suero.

Koch ha hecho construir un aparato especial representado por la Figura 34, en el cual los tubos se mantienen naturalmente en el grado de inclinación que se desea, y el aparato va provisto de un regulador Arsonval que describiremos más adelante.

La temperatura que se emplea es la de 65 á 68° y los tubos son dejados el tiempo necesario para obtener la gelatinización. Se reconoce que se ha llegado á ésta cuando el suero está solidificado y toma una apariencia sombría ó una semi-transparencia especial. El tiempo necesario para la gelatinización es variable, oscilando entre 30 y 60 minutos.

En lugar del aparato de Koch se puede emplear la estufa de Arsonval á una temperatura de 65 á 68°.

Consiste este aparato (Fig. 35) en un cilindro vertical terminado por dos conos. La estufa se abre por una puerta lateral y está dividida por una placa agujereada en dos porciones independientes. El cono inferior lleva el regulador completamente metálico y dos mecheros provisto cada uno de su llave. El cono superior lleva en su extremidad el tubo, por medio del cual se llena el aparato.

El espacio anular que existe entre las dos paredes de la estufa está lleno de agua y este agua, que se calienta por la llama de los mecheros de gas que atraviesan su masa mediante tubos chimenea, como se ve en el aparato, produce la calefacción. El aparato lleva también un termómetro que sirve para regular la temperatura.

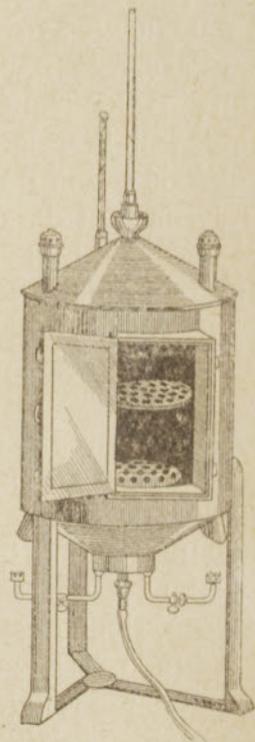


FIG. 35

Estufa de ARSONVAL.

Los tubos de suero se ponen en el aparato colocándolos con la inclinación necesaria.

Patatas como medio sólido de cultivo. — La patata debe ser preparada:

- 1.º En cristalizador cerrado.
- 2.º En tubo de ensayo.

Se toman las patatas de buena calidad, se las lava con un cepillo y se las sumerge en una solución de sublimado al 1 por 1000 durante una hora.

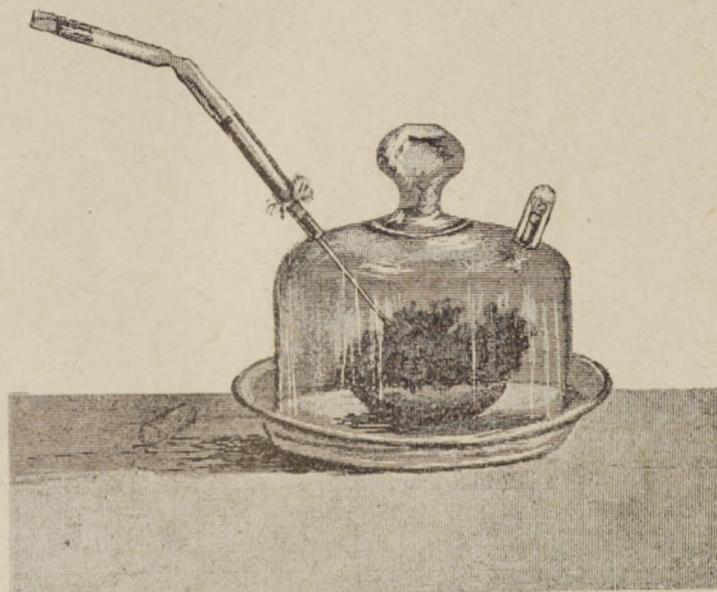


FIG. 36

Manera de efectuar cultivos sobre pedazos de esponja esterilizados é impregnados de un líquido nutritivo (FERRÁN).

Con esta solución se lava el cristalizador y en su fondo se ponen discos de papel filtro. Se divide cada patata en dos mitades iguales y cada una de ellas es colocada en un cristalizador sobre el disco del filtro, humedeciendo éste con la solución de sublimado.

Cerrados herméticamente los cristalizadores por medio de sus cubiertas, son colocados en la autoclava, y sometidos á una temperatura de 100° durante una hora y á 115 durante un cuarto de hora. Después se apaga el fuego del aparato, se deja enfriar y la patata está dispuesta para la siembra.

J. Ferrán emplea un cristalizador representado en la Fig. 36, para efectuar cultivos sobre esponja convenientemente preparada. La técnica de esta operación la describiremos más adelante al tratar de los cultivos.

Estufa de incubación. — Uno de los aparatos de uso más frecuente en técnica bacteriológica es la estufa de Roux, que no solamente puede servir como aparato de esterilización sino como medio

de cultivo que facilita las temperaturas convenientes para el desarrollo de los gérmenes que contienen dichos medios.

La estufa de Roux es la antigua estufa de Pasteur calentada directamente por el gas, según el sistema de M. Schribaux y provista de un regulador de los más simples y sólidos, imaginado por M. Roux.

La Fig. 37 representa esta estufa en su conjunto, con sus compartimientos, su rampa de gas y su regulador.

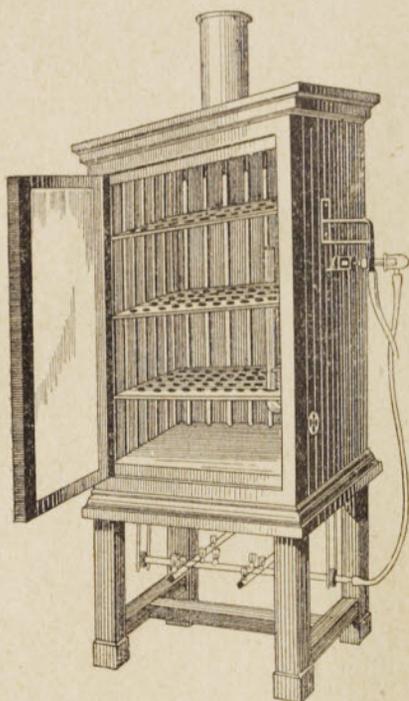


FIG. 37

Estufa de Roux con regulador automático.

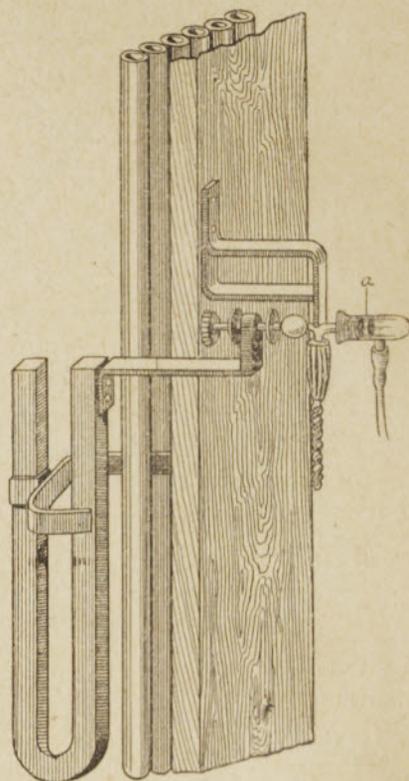


FIG. 38

Regulador automático de la estufa de Roux.

Este último merece ser conocido en detalle y por tanto damos también su representación en la Fig. 38.

Consiste en dos barras metálicas, una de acero y otra de cinc, soldadas en toda su longitud y recurvas en forma de U.

El metal más dilatante, que es el cinc, está en la parte de afuera, y toda elevación de temperatura tenderá á aproximar las ramas metálicas, así como todo descenso apartará la una de la otra.

El principio de regulación del aparato consiste en fijar y ajustar sobre una de estas ramas una varilla que seguirá sus movimientos é irá á abrir ú obstruir la llegada del gas que viene á la estufa.

El regulador está por consiguiente colocado verticalmente cerca de una de las paredes laterales de la estufa, teniendo su abertura

en U hacia arriba. La rama más apartada de la pared está fija á la estufa; la otra, que es la que sólo puede moverse, lleva una varilla horizontal que sale de la estufa por una abertura suficiente para que pueda moverse libremente.

Al salir de la estufa esta varilla se encorva en ángulo recto y atraviesa por medio de un tornillo que puede estar fijo en un punto cualquiera de su curso por medio de una tuerca. La extremidad de este tornillo puede ser puesta en contacto con una pequeña válvula que regula el paso del gas y que completa el aparato.

El funcionamiento del aparato es muy regular, y cada compartimiento de la estufa tiene una temperatura especial pero siempre constante.

Inoculaciones. — Los animales sobre los cuales se hacen las experiencias bacteriológicas, son casi exclusivamente la cobaya, el conejo, el ratón, la gallina, el palomo y el gorrión.

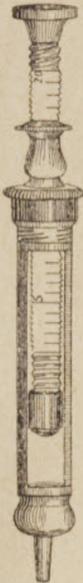


FIG. 39

Jeringa de STRAUS COLIN.

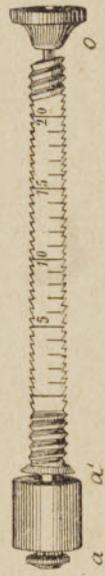


FIG. 40

Pistón de la jeringa STRAUS COLIN.

El perro, tan empleado en fisiología, es refractario á la mayor parte de las enfermedades bacterianas. El carnero y el cerdo se emplean raras veces á causa de su valor pecuniario.

En cuanto al material general para las inoculaciones, ocupa el primer lugar la jeringa de Straus Colin representada en la Fig. 39, cuyo precio es módico. Está construída sobre el modelo de la jeringa de Pravaz y tiene todas sus ventajas; la diferencia consiste en la confección del pistón, que está construído con médula de saúco y se presta á la desinfección en el agua caliente ó en el autoclava, pudiendo ser cambiado á voluntad y confeccionado por el mismo operador.

Para desinfectar esta jeringa basta en la práctica sumergirla en

agua hirviendo durante 10 minutos después de haberla llenado de agua. Debe hacerse esta desinfección antes y después de haberse servido del aparato.

Las cánulas deben ser desinfectadas como la jeringa y por el mismo procedimiento.

Las cánulas ordinarias de acero presentan el inconveniente de oxidarse al pasar por ellas el agua hirviendo, cuyo inconveniente se evitará sumergiendo dichas cánulas en el alcohol absoluto al sacarlas del agua hirviendo, manteniéndolas en él entre una y otra operación.

Es preferible servirse de cánulas de platino *iridiado*, cuyo precio es un poco más elevado, pero duran más y no se oxidan.

En cuanto al pistón de esta jeringa (Fig. 40), debemos advertir que la médula de saúco está colocada entre dos discos metálicos *a* y *a'*, que por medio de un tornillo en *a* pueden aproximarse ó separarse aumentando ó disminuyendo el diámetro del cilindro de médula de saúco para que ajuste más ó menos, según las necesidades, en el interior de la jeringa.

Materias de inoculación. — Las materias para las inoculaciones son de dos especies.

1.^a Productos de cultivo.

2.^a Productos patológicos.

Proceden los primeros de medios líquidos ó de medios sólidos. Los líquidos no ofrecen dificultad alguna, porque recogidos en toda su pureza con una pipeta Pasteur, se colocan en un pequeño vaso de pie, esterilizado y provisto de una tapadera de papel también esterilizado. Para verificar la inyección no habrá más que atravesar el papel de la tapadera con la cánula de la jeringa y hacer la succión elevando el émbolo.

Los productos de cultivo sobre medios sólidos se tratan de la manera siguiente: con una aguja de platino esterilizada se toma una parte de cultivo y se lleva al vaso de pie, en el cual se ha puesto previamente agua ó caldo esterilizados. Se agita el líquido rápidamente con una varilla de cristal igualmente esterilizada y se recubre el aparato con su tapadera de papel. El líquido se toma con la jeringa, como ya hemos indicado.

Los productos patológicos pueden ser líquidos, como la sangre, el pus, los líquidos peritoneales, etc., que se recogen puramente en una pipeta Pasteur y según el método que diremos adelante. Se abre la pipeta y por medio de la jeringa se toma la cantidad necesaria para la inoculación.

En algunos casos la sangre coagulada exige una operación. Es preciso deshacer los coágulos con el suero, puesto que son aquellos los que contienen mayor cantidad de materia virulenta.

Esta operación se efectúa en el mortero ó en la cápsula de platino. De igual manera se tratará el pus espeso y caseoso como el pus del conejo en general. Los productos patológicos sólidos, como

los fragmentos del bazo, de los ganglios, de los músculos, etc., también deben ser preparados en el mortero.

Procedimientos de inoculación. — Todo procedimiento de inoculación debe ser hecho antisépticamente. La región sobre la cual se opera ha de ser preparada, lavada con sublimado y hasta cauterizada con una varilla calentada á la llama, igualmente que los instrumentos que hayan de servir para practicar la inoculación.

Inoculaciones superficiales. — Después de haber afeitado los pelos de la región donde se haya de efectuar la inoculación, se hacen con el bisturí pequeños cortes paralelos teniendo cuidado no interesar más que la parte superficial del dermis. Cuando ha cesado la pequeña hemorragia que pueda sobrevenir, se deposita en la superficie de las escarificaciones la substancia virulenta, que se fija por medio de fricciones.

Inoculaciones subcutáneas. — Córtanse los pelos de la parte en que haya que verificar la inoculación, lavando con sublimado ó cauterizando la región elegida. Estando el animal bien sujeto por un ayudante, se toma un pliegue de la piel y se introduce la cánula en la base de este pliegue. Entonces se empuja suavemente la cantidad conveniente del líquido, cuya cantidad se habrá marcado previamente por medio de la corredera sobre la varilla del pistón, asegurándose de que el líquido ha penetrado bien en la hipodermis.

Inoculaciones intraperitoneales. — Después de la preparación de la región abdominal según se ha dicho en los casos anteriores, se hace sostener el animal por un ayudante. Se toma un pliegue que comprenda todo el espesor de la pared abdominal, lo cual es fácil en los animales pequeños, y se introduce la cánula en la base de este pliegue. Abandónase el pliegue y se busca la seguridad de que la aguja ha penetrado en la cavidad abdominal. Entonces se ajusta el cuerpo de bomba y se inyecta la cantidad conveniente del líquido.

Damos á continuación el modelo de una cánula cuyo uso es muy cómodo. Consiste en una aguja de acero ó de platino iridiado, la cual es gruesa á excepción de su parte terminal en la cual es *llena*. Esta aguja es curva y en la parte media del arco que describe hay un agujero. Se toma un pliegue en la pared del abdomen del animal, como ya hemos dicho, se atraviesa de parte á parte este pliegue con la aguja y se abandona dicho pliegue, de modo que la parte agujereada de la aguja se encuentra en la cavidad abdominal. Después se adapta el cuerpo de bomba y se hace la inyección.

He aquí ahora un procedimiento que pone al abrigo de todo accidente cuando se practica la inyección intraperitoneal sobre animales de pequeña talla, como palomos, ratones, etc. Este procedimiento es debido á MM. Nocard y Roux.

Las Figs. 41, 42 y 43 representan el juego de cánulas necesarias para esta operación. La Fig. 41 es una aguja hueca que por una parte se adapta sobre la jeringa de Pravaz y por la otra es obtusa. La Fig. 42 es una aguja hueca terminada por una extremidad

apuntada y de un diámetro tal que pueda contener á la de la figura anterior. Añadamos, y esto es lo esencial, que la varilla primera es más larga que la segunda, de modo que la extremidad obtusa de aquélla, cuando se halla colocada en el interior de la segunda, sobresale un medio centímetro de la extremidad apuntada de la segunda.

Cuando se quiere practicar una inoculación intraperitoneal sobre un palomo, por ejemplo, se coloca el animal con el vientre hacia arriba y las patas hacia adelante. Con una esponja empapada en una disolución antiséptica se separa el plumón entre la punta del esternón y la cloaca. Se coge con una pequeña pinza la piel y la pared muscular del abdomen sobre la línea media á la del esternón, y se levanta la pinza.



FIG. 41



FIG. 42



FIG. 43

Cánulas para las inyecciones intraperitoneales.

Además se ha preparado una aguja de coser que lleva un hilo antiséptico; se introduce esta aguja en la base de la parte levantada por la pinza, se pasa el hilo que atraviesa así el peritoneo y penetra en la cavidad abdominal y se abandona entonces la pinza.

Con la mano izquierda se cogen los dos extremos del hilo del cual se tira hacia arriba y hacia adelante y con la mano derecha se punciona con la aguja apuntada en la base del pliegue. Esta aguja sólo debe penetrar muy poco en la cavidad peritoneal.

Entonces se toma la jeringa cargada con la materia que se ha de inocular y se adapta á la aguja obtusa; se introduce ésta en el canal de la segunda, y la extremidad de la primera viene á parar al peritoneo antes que la punta de la segunda. Se abandona el hilo y baja la parte levantada; se retira el hilo y se pone la inyección, quedando así evitado todo peligro de perforación intestinal.

Inoculación en el pulmón. — Preparada la región sobre la línea axilar, se punciona decididamente entre dos espacios intercostales reconocidos previamente.

Inoculación en la cámara anterior del ojo. — Estas inoculaciones han llegado á ser el medio más sencillo y más eficaz para transmitir la rabia á los animales. Para practicarlas se insensibiliza desde luego la superficie ocular por medio de la cocaína y después de algunos momentos se hace penetrar la cánula de la jeringa en la cámara anterior y se pone la inyección.

Inyecciones intravenosas. — Para ellas no deben emplearse sino materias cuidadosamente preparadas y filtradas. Una embolia mortal sería el resultado de la penetración de cualquier fragmento sólido en el sistema circulatorio. Después de desinfectar la región elegida, se hace resaltar la vena por la compresión practicada debajo del punto elegido para la inyección y se pica con la cánula. Sale una gota de sangre que indica que la cánula está en su puesto y entonces se pone poco á poco la inyección.



FIG. 44

Aparato para inyecciones intravenosas.

Si el líquido se extiende en el tejido celular, lo cual se indica por el edema que sobreviene en seguida, la inoculación es defectuosa y debe repetirse.

Para las inyecciones de líquidos en gran cantidad se necesitan aparatos especiales. El representado por la Fig. 44 es el que se emplea comúnmente; consiste en un frasco *f* de cuello ancho provisto de un tapón de caucho con dos agujeros. Este frasco puede ser graduado.

El tapón de caucho está atravesado por dos tubos, uno y otro encorvados en ángulo recto por encima del tapón. El tubo *c* penetra apenas en el frasco y el tubo *a* se sumerge hasta el fondo del mismo. Para montar el aparato se estrangula ligeramente el tubo *c* en la parte *b* donde se coloca un tapón de algodón.

Al tubo *a* se adapta otro de cauchuc que lleva una llave en la extremidad *s*. Sobre esta llave se monta una cánula para inyecciones.

Llévase todo el aparato á la autoclava y se esteriliza, y para hacerle funcionar basta llenar con el líquido que se ha de inyectar la capacidad del vaso, adaptar un soplador cualquiera al tubo *c*, hacer funcionar el insuflador de modo que el líquido suba por el tubo *a* y así se podrá inyectar en las venas del animal la cantidad de líquido que se quiera.

CAPÍTULO VII

Técnica general de los cultivos.—Cultivos en los caldos.—Cultivos sobre medios sólidos.—Cultivos sobre placas.—Cultivos sobre placas según el método de Koch.—Cultivo sobre placas por el procedimiento de Roux.—Procedimiento de las cajas de Petri.—Cultivo en placas sobre gelosa.—Microbios anaerobios.—Cultivos de anaerobios sobre medios líquidos.—Preparación del tubo.—Siembra.—Cultivo en las pipetas Pasteur.

BIBLIOGRAFÍA.—Thoinot: *Préc. de Microb.*—Wurtz: *Techniq. bact.*—Robin: *Trait. du Microscop.*—Cuenot: *L'infl. du milieu.*—Le Dantec: *La matière vivante.*

Técnica general de los cultivos. — Los cultivos tienen por objeto reproducir y desarrollar los gérmenes virulentos, ó para su estudio ó para cualesquiera otro uso de laboratorio.

Siendo los microbios de dos principales especies, *aerobios* y *anaerobios*, cada una de estas clases exige una técnica particular para su cultivo, la cual también es diferente según que sean líquidos ó sólidos los medios en que se realice.

Ya hemos tratado en otro lugar de la pipeta de Pasteur que es uno de los instrumentos indispensables para las siembras; diremos ahora algunas palabras sobre otro de estos pequeños instrumentos que es de uso constante, el hilo de platino.

Deben tenerse en el laboratorio varios de estos hilos representados sobre su montura en la Fig. 45, debiendo preferirse los de platino iridiado. Deben tener una longitud superior á la de los tubos de ensayo y se les monta sobre un mango de madera ó sobre una varilla de cristal, como puede observarse en la figura.

Para servirse del hilo de platino se comienza por esterilizarlo, lo cual se consigue elevando su temperatura hasta el rojo en la llama de una lámpara de alcohol y dejándolo después que se enfríe, lo cual se consigue inmediatamente. En tal caso debe emplearse en seguida, pues de otra manera se perdería el trabajo empleado. Por regla general el hilo de platino debe esterilizarse cuidadosamente inmediatamente después de empleado.

También en algunos casos se emplean para las siembras agujas

de cristal, especialmente en los cultivos de microbios anaerobios. Estas agujas tienen la forma de pipetas Pasteur y se esterilizan pasándolas repetidas veces sobre la llama. La Fig. 46 representa su forma ordinaria.



FIG. 45

Hilos de platino montados sobre mango de madera.



FIG. 46

Aguja de cristal para los cultivos de los microbios anaerobios.

Cultivos en los caldos. — Generalmente se emplea un matraz Pasteur que contenga un caldo esterilizado y que no se enturbie por su permanencia prolongada en la estufa durante 35 á 40°. Para hacer la siembra se abre un matraz con la mano izquierda poniéndolo horizontalmente y manteniéndolo fijo en esta posición mientras que con la mano derecha se quita el tapón, se pone entre los dedos de la mano izquierda y sin cambiar la posición del globo ni mover la mano que lo tiene, se toma la semilla con la pipeta Pasteur ó con el hilo de platino, sobre el fondo del globo. En seguida se deposita en el líquido esta semilla, se tapa el matraz y se pone sobre él una etiqueta indicando la naturaleza del cultivo, su procedencia y la fecha de la operación.

Cultivo sobre medio sólido. — Generalmente se emplea la gelatina, como ya hemos indicado, la cual forma un cilindro que llena exactamente la tercera parte de un tubo de ensayo. También puede estar dispuesta sobre placas, como diremos más adelante.

Abierto el tubo de gelatina con todas las precauciones conve-

nientes, se toma la semilla con el hilo de platino esterilizado y se coloca la extremidad sobre la superficie de la gelatina introduciéndola en el tubo hasta el fondo, retirando el hilo y cerrando el tubo.

El mismo procedimiento se sigue para las siembras sobre la gelosa ó el suero sólido.

Cultivo sobre placas. — Hácese sobre la gelatina pura ó sobre la gelatina con gelosa, lo cual hace que el medio se solidifique antes y se licue menos á las altas temperaturas.

Para practicar la operación se extiende una pequeña cantidad de gelatina líquida y sobre ella una pequeña cantidad de gérmenes, haciendo después que se solidifique el medio estableciéndolo sobre una superficie plana. Los gérmenes se difunden y desarrollan aisladamente en el sitio en que han quedado en el momento de la solidificación.

El cultivo sobre placas comprende tres operaciones:

1.^a Aislamiento de los diferentes gérmenes contenidos en un medio cualquiera como el agua, el suelo, las materias fecales, los tejidos, etc.

2.^a Purificación de un cultivo impuro por la separación de las especies microbianas que contenga.

3.^a Estudio de la forma que toma la colonia pura de tal ó cual microbio; esta forma es á las veces característica para un microbio determinado.

Cultivos sobre placas según el método de Koch. — Los instrumentos necesarios para estas operaciones son:

1.^o El pequeño tambor metálico de Roux sostenido por tornillos que permiten colocarlo horizontalmente. En los dos extremos de un diámetro hay dispuestos dos tubos que pueden dar paso á una corriente de agua, según puede verse en la Fig. 47.

Una campana de cristal y un nivel de agua completan este pequeño aparato.

Cuando no se tiene el tambor de Roux, puede sustituirse con un triángulo de madera provisto de tornillos para ponerlo horizontal, según se ve en la Fig. 48.

Empléase además en este caso una ancha placa de cristal, un cristalizador recubierto con una placa de cristal y un nivel con burbuja de aire.

2.^o También puede emplearse un vaso compuesto de dos partes:

a) Un cristalizador recubierto por

b) Una tapadera de la misma forma, más ancha y que lleva sobre su superficie superior un botón de cristal. (Fig. 49.)

3.^o Empléanse igualmente banquillos de cristal (Fig. 50), cuyo uso se comprende con la sola inspección de la figura.

4.^o Finalmente son de uso común las placas de cristal esterilizadas y contenidas, hasta el momento en que han de usarse, en una caja de chapa de hierro esterilizada.

Para operar con estas placas se emplea el aparato de Roux instalado en perfecta horizontalidad. Cuando se carece de este aparato, se coloca el triángulo de madera, que ya conocemos, sobre una mesa (Fig. 51), y sobre este triángulo una ancha placa de cristal sobre la cual se pone el cristalizador lleno de agua fría y recubierto con otra placa de cristal.

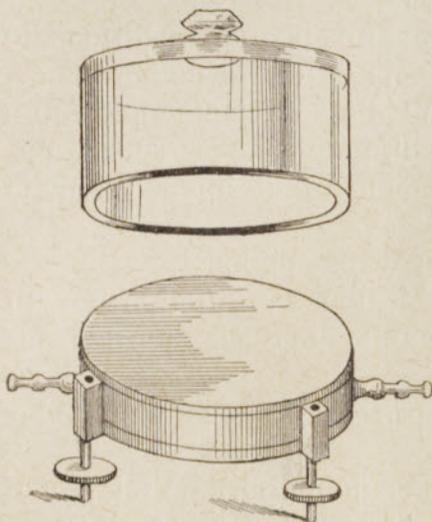


FIG. 47

Tambor metálico (ROUX) y campana de cristal para cultivos sobre placas según el método de Koch.

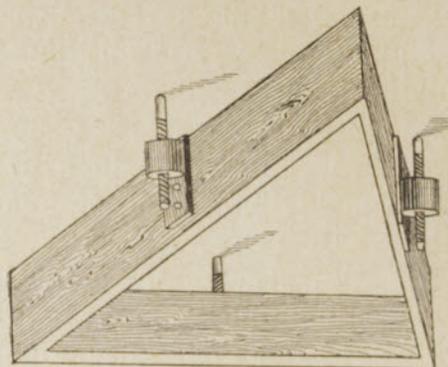


FIG. 48

Triángulo de madera, empleado en los cultivos sobre placas (método de Koch).

Colocado el aparato en perfecta horizontalidad, se prepara la campana, haciendo una cámara húmeda, aséptica y antiséptica. Al efecto se limpian perfectamente las dos placas que la componen, se pone en el cristalizador una hoja de papel filtro, se vierte en cada una de las dos partes de la campana una solución de sublimado al 1 por 1000 que se hace llegar á toda la superficie del aparato; se vacía completamente el cristalizador superior, pero sólo se quita una parte de la solución desinfectante del cristalizador inferior; se cierra la campana y se coloca sobre la placa de cristal.

Entonces se ponen á mano en un recipiente lleno de sublimado á la milésima, tres bancos de cristal y tres tiras de papel filtrado de la longitud de estos bancos, numerados con los números 1, 2 y 3.

Se prepara igualmente la caja de hierro que contiene las placas de cristal esterilizadas, una lámpara de alcohol, un hilo fuerte de platino y algunas pipetas.

Entonces se toman tres tubos de gelatina poco llenos y se llevan estos tubos á la estufa ó á un baño maría de 37 á 40° para licuar la gelatina.

El contenido del tubo que contiene el cultivo cuyos gérmenes deben ser aislados, se licua igualmente de la misma manera.

Se coge este tubo entre el pulgar y el índice de la mano izquierda, aproximándolo lo posible á uno de los tubos de gelatina fundida en la estufa ó en el baño maría; se destapan ambos tubos y con una pipeta esterilizada se aspira un poco de líquido del primer tubo y se deja caer este líquido gota á gota en uno de los tubos de gelatina, cerrando inmediatamente este tubo y marcándolo con el núm. 1, agitándolo suavemente para repartir la semilla en todo el espesor de la gelatina.

Si el cultivo impuro está contenido en un matraz, la operación es también muy sencilla, pues con la pipeta se toma un poco de líquido del matraz y se pone gota á gota en el tubo de gelatina número 1.

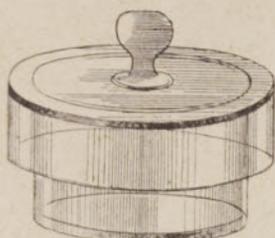


FIG. 49

Cristalizador. (Koch).



FIG. 50

Banquillo de cristal. (Koch).

De este tubo núm. 1 y empleando una nueva pipeta se toma un poco de líquido que también se pone gota á gota en un segundo tubo de gelatina marcado con el núm. 2. Con este tubo se practica la misma operación tomando de él algunas gotas de líquido con una nueva pipeta, cuyo líquido se vierte en otro tubo de gelatina marcado con el núm. 3.

Estos tubos, números 1, 2 y 3, deben permanecer en condiciones de que la gelatina esté líquida hasta el momento en que se vierta sobre las placas de cristal.

En este momento se inclina la caja que contiene las placas, se toma una de éstas con una pinza esterilizada y se la coloca horizontalmente sobre la placa superior del aparato refrigerante, cubriéndola con la tapadera, según hemos indicado anteriormente.

Para repartir sobre esta placa el contenido del tubo núm. 1, se levanta la tapadera, se destapa dicho tubo, se pasan sus bordes sobre la llama de la lámpara de alcohol y se vierte el contenido ó parte de él sobre dicha placa. Se pone nuevamente la tapadera y se deja enfriar la gelatina, preparando entre tanto la campana que debe recibir las placas.

Al efecto se pone en el cristalizador inferior de la campana de Koch y sobre papel filtro humedecido, un banco de cristal que en este momento se retira de la solución de sublimado en la cual estaba sumergido, cuyo banco se recubre con la tira de papel filtro núm. 1, cerrando en seguida la campana.

Cuando la gelatina se ha solidificado sobre la placa, se toma ésta y se la pone rápidamente en la campana sobre el banco de cristal. Antes de cerrar la campana se pone sobre el primer banco de cristal otro recubierto también con el papel filtro núm. 2 y se cierra la campana haciendo sobre este banco la misma operación que con el primero y procediendo de igual manera para el marcado con el número 3. La operación queda terminada y sólo falta poner la cubierta sobre la campana. La Fig. 52 representa la disposición de esta operación.

Es preciso no abrir la campana antes del desarrollo suficiente de las colonias, pues habría peligro que los gérmenes del aire se depositaran sobre la superficie de las placas.

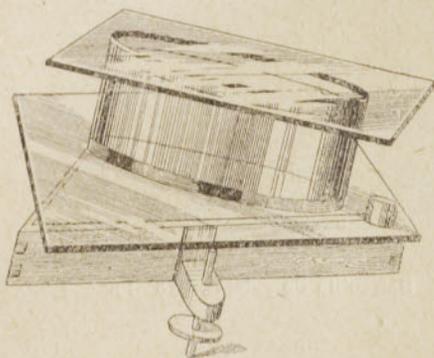


FIG. 51

Montura del cristizador.



FIG. 52

Campana de Koch, para cultivo sobre placas.

Cultivos sobre placas por el procedimiento de Roux. — Este procedimiento tiene la ventaja de permitir la conservación pura de los microbios de evolución lenta como los de la tuberculosis. El autor sustituye con tubos las placas, dando á dichos tubos de cristal la longitud de 25 á 30 centímetros y de 2 á 3 de diámetro. Una pequeña cantidad de gelatina y gelosa ó de gelosa glicerizada, según el caso, es introducida en el fondo de los tubos, los cuales se cierran con tapón de algodón, esterilizándolos en la autoclava á la temperatura de 115°. (Fig. 53.)

Para utilizar estos tubos se funde la gelatina y se verifica la siembra cuando todavía está líquida. Al efecto se agita vivamente el tubo y se coloca sobre un plano horizontal, haciéndole girar sobre su eje de modo que la substancia nutritiva se distribuya en una capa uniforme sobre la pared inferior é interior del tubo.

Si la siembra se ha hecho convenientemente, las colonias que se desarrollen quedarán completamente aisladas.

La capa sólida debe ser delgada para que se pueda examinar fácilmente y observar las colonias con el microscopio á través del cristal. El tubo está cerrado con un capuchón de cauchuc y puede

permanecer en la estufa sin secarse todo el tiempo que sea necesario.

Si se forman colonias en la superficie de la capa nutritiva y si es necesario examinarlas por su superficie libre, se hace por medio de un diamante montado sobre una varilla rígida, un trazo sobre la pared interior del tubo de cada lado y paralelamente á la superficie del sólido nutritivo, separando así el tubo en dos semicilindros, uno de los cuales contiene la instalación del cultivo. En tal caso es fácil examinar este semicilindro considerándolo como una placa sobre la platina del microscopio.

Procedimiento de las cajas de Petri. — Ya hemos dicho en qué consisten estos aparatos. Cuando se quisieren utilizar, como medio de cultivo, se levanta un poco la tapadera y se vierte en el cristizador inferior el contenido del tubo de gelatina que contiene la dilución de semilla que se ha de repartir. Se coloca nuevamente la tapadera y se mueve suavemente el aparato para distribuir de una manera regular la capa de gelatina. Cuando ésta se ha solidificado, las cajas de Petri pueden quedar á la temperatura del laboratorio ó ponerse en la estufa de 18 á 22°.

Cultivo en placas sobre gelosa. — Estudiaremos el método ordinario que se aplica á la separación de los gérmenes y al estudio de las formas de sus colonias en la gelosa, y después el método de separación de ciertos microbios en cuanto sea aplicable, tanto á la gelosa como al suero.

1.º Empléase la caja de Petri con exclusión de cualquier otro aparato. En una caja de Petri perfectamente esterilizada se vierte el contenido de un tubo de gelosa, licuada previamente sobre la llama del gas ó al baño maría, dejándola después que se enfríe sobre la placa al abrigo del aire.

Entonces, por la extremidad del hilo de platino, cargado con los microbios que se desea separar, se practican seis ó siete estrías en la superficie del medio nutritivo. Estas estrías, que pueden disponerse de manera que formen cuadrículas, deben hacerse ligeramente y sin que penetren mucho en la capa de gelosa. El hilo de platino deposita poco á poco los gérmenes sobre el medio nutritivo, y las colonias del microbio quedan suficientemente espaciadas para que se verifique entre ellas el aislamiento y para que puedan ser, por consiguiente, separadas.

2.º Tómense cinco ó seis tubos de gelosa ó de suero y numérense. Sobre la superficie inclinada de cada uno de ellos y sucesivamente se pasa la extremidad del hilo de platino cargado con más substancia que contienen los gérmenes que se han de aislar. Los primeros tubos contendrán colonias apretadas y poco fáciles de re-

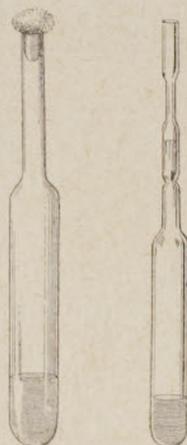


FIG. 53
Tubos de cristal (Roux)
para
cultivos sobre placas.

conocer, pero los últimos presentarán colonias perfectamente aisladas y distintas, que serán fáciles de recoger para examinarlas y estudiarlas.

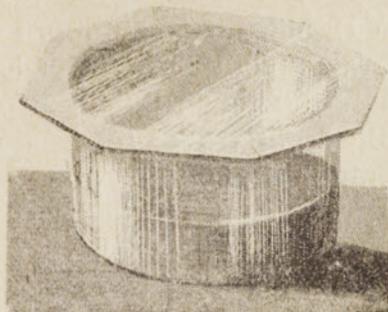


FIG. 54

Cristalizador dispuesto para cultivos.
(FERRÁN.)

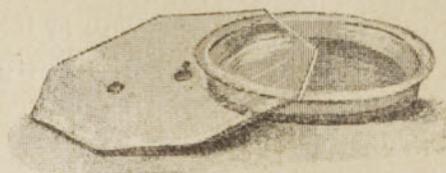


FIG. 55

Platillo de cristal para cultivos sobre estratos de gelatina ó de agar. (FERRÁN.)

Es de suma importancia tener en cuenta en este género de trabajos, que no siempre se dispone en condiciones normales del abundante material de laboratorio indispensable para estos estudios. Las Figs. 54, 55, 56 y 57, ideadas por J. Ferrán, dan facilidades para transformar en cristalizadores y cámaras de cultivo los aparatos más sencillos, lo cual es de capital importancia tratándose de localidades en que no siempre es posible adquirir los aparatos sin los cuales es imposible verificar ni el más sencillo cultivo. Consignamos con satisfacción los laudables esfuerzos que para popularizar y facilitar los estudios de esta índole en nuestra patria viene realizando el incansable Dr. Ferrán, al cual tanto debe la microbiología aplicada á la patología y á la terapéutica.

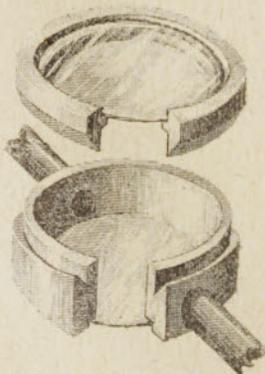


FIG. 56

Cámara húmeda para cultivos, modelo J. FERRÁN.

Microbios anaerobios. — El cultivo de los anaerobios tiene una gran importancia para las aplicaciones prácticas y no presenta grandes dificultades, como vulgarmente se cree. Este cultivo en medios sólidos es de los más sencillos, y tratándose de medios sólidos

dos, aunque la separación de las especies anaerobias sobre gelatina ó gelosa es algo más compleja, su mecanismo se aprende muy pronto.

Al tratar de estos cultivos deben hacerse algunas observaciones generales aplicables á todos ellos.

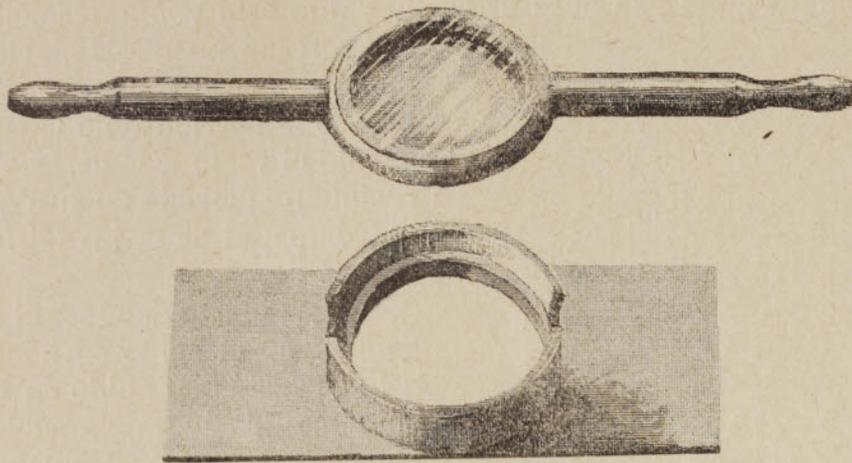


FIG. 57

Cámara húmeda para cultivos, modelo J. FERRÁN.

En primer lugar, para emprender este género de estudios es preciso disponer:

- a). De una máquina para hacer el vacío.
- b). De un gasómetro lleno de un gas inerte.

Para hacer el vacío son indispensables dos aparatos:

- La máquina pneumática de Alvergnyat.
- La trompa de agua de Alvergnyat.

La máquina pneumática de mercurio de Alvergnyat (Fig. 58) es un aparato de una perfección absoluta que permite hacer el vacío hasta los últimos límites, siendo su único inconveniente el ser bastante cara. En esta figura se ve en *o* un tubo doble de Pasteur. *G* es un gasómetro de hidrógeno ó de cualquier otro gas inerte.

La descripción y detalles de este aparato se encuentra en los tratados elementales de Física.

La trompa de agua es de un precio menos elevado y puede emplearse siempre que se disponga de un chorro de agua de fuerte presión. Sin embargo, el vacío producido por este aparato representado por la Fig. 59 es menos perfecto que el vacío producido por la bomba de mercurio, no olvidando tampoco que la exposición de los medios de cultivo á la acción de un gas inerte se impone en absoluto cuando se emplea la trompa, mientras que con la máquina pneumática puede emplearse ó no.

Puede hacerse uso, ó bien de la trompa de cristal, la cual se monta fácilmente sobre una llave que dé paso al agua por medio de

un tubo de caucho, ó bien la trompa con montura metálica que se encuentra generalmente en el comercio, la cual es preferible.

Se sabe que cuando se hace uso de la trompa montada sobre una llave de agua, el tubo de caucho que sirve de continuación á la rama vertical debe llevar, ó una llave movable ó una pinza de presión, destinadas á cerrar toda comunicación entre la trompa y el recipiente donde se hace el vacío, y que esta comunicación debe

ser cerrada cuando todavía funciona el aparato. Si se pasase de pronto la corriente de la trompa, siendo el vacío más perfecto en el recipiente privado de aire que en la trompa, el agua invadiría este recipiente.

El gas inerte debe ser el hidrógeno y no el ácido carbónico, y este gas está contenido en un gasómetro de agua, de modelo bien conocido en todos los laboratorios.

Este gas hidrógeno debe ser absolutamente puro, obteniéndolo preferentemente con el cinc y el ácido clorhídrico ó sulfúrico puros. Se le lavará y purificará en una serie de frascos lavadores que contengan agua, potasa, nitrato de plata y ácido sulfúrico. El agua del gasómetro contendrá además una disolución de hidrosulfito de sosa. Es conveniente disponer la operación de modo que el recipiente que contiene el cultivo que se ha de privar de aire, la máquina para hacer el vacío y el gasómetro estén enlazados de ma-

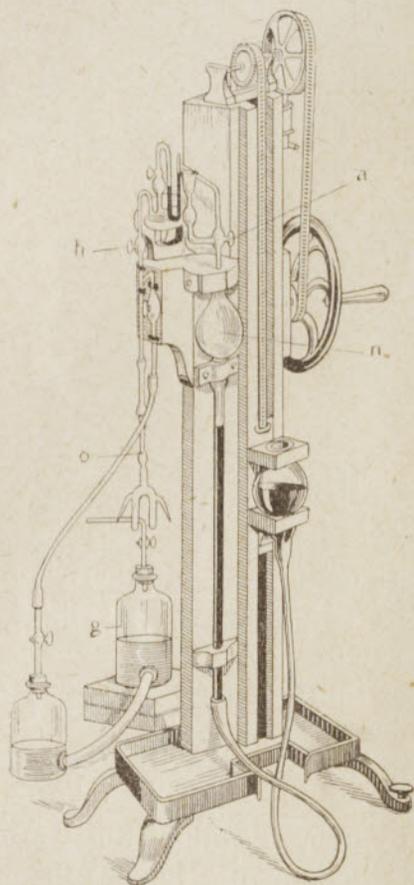


FIG. 58

Máquina de ALVERGNIAT, ó máquina neumática de mercurio.

nera que el recipiente comunique á voluntad ó con la máquina de hacer el vacío ó con el gasómetro por un simple juego de llave.

La máquina de Alvergñiat se presta perfectamente á esta disposición, pudiendo aplicarse á la vez al tubo de entrada del gas inerte y al recipiente en que se ha de hacer el vacío, y por un juego de llaves vaciar el recipiente de aire, llenarlo de gas, desalojar este gas, etc.

Cuando se hace uso de la trompa, se puede adoptar el siguiente modelo ó cualquiera otro análogo. Sea *a* una llave de tres conductos (Fig. 60) que haga comunicar dos á dos ó bien el tubo relacionado con la trompa *o*, ó bien el tubo de caucho montado sobre la llave

de tres agujeros que soporta el recipiente que contiene el medio de cultivo. Sea *a* el tubo por donde entra el gas hidrógeno. Sobre el trayecto del tubo vertical se interpondrá en un punto cualquiera *v* un barómetro ó un indicador metálico del vacío. La llave de tres agujeros y los tubos que ponen en comunicación esta llave con la trompa por una parte y con el gasómetro por otra, deben ser preferentemente de cobre. El aparato así constituido resulta cómodo y barato.

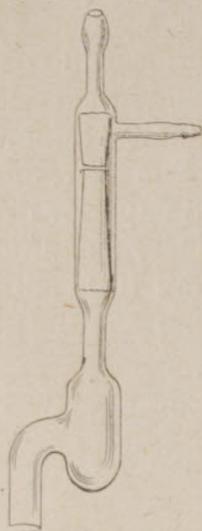


FIG. 59

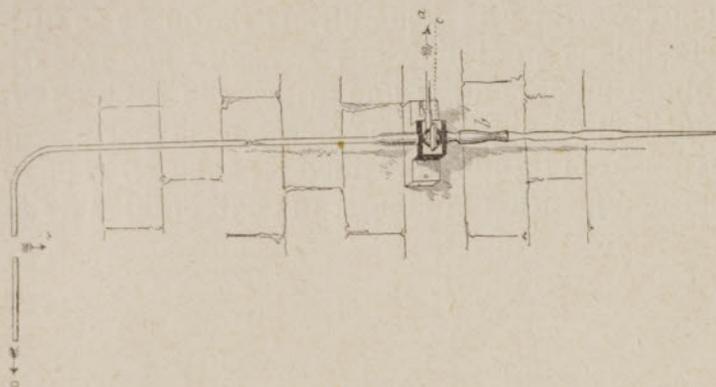


FIG. 60

Detalles de la trompa de ALVERGNIAT.

La Fig. 61 representa un esquema del presente modelo de la máquina de Alvergniat. A la izquierda se ve un tubo en el cual se ha de hacer el vacío, y en el centro otro tubo de cauchuc destinado á comunicar con el gasómetro de hidrógeno.

Cultivo de anaerobios sobre medios líquidos. — En la práctica conviene emplear para estas operaciones el tubo doble de Pasteur, el tubo simple del mismo ó la pipeta de Pasteur.

En el primer caso, la técnica de la operación comprende los extremos siguientes:

- 1.º Preparación del tubo.
- 2.º Siembra.
- 3.º Extracción del aire y sustitución por el hidrógeno.
- 4.º Cierre del tubo sembrado vacío ó lleno de hidrógeno.

Preparación del tubo. — Sobre un tubo doble de Pasteur, esterilizado y tapado con algodón, se estira á la llama la parte que está por encima del tapón de algodón, se corta el tubo en su parte superior y se redondea á la llama dicha extremidad de modo que pueda penetrar fácilmente en el tubo de

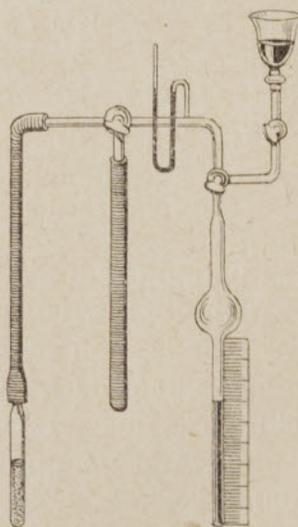


FIG. 61

Esquema de la máquina de ALVERGNIAT.

cauchuc que se le adaptará después. Entonces se separan de su posición vertical cada uno de los pequeños tubos laterales y se afilan á la llama las extremidades de éstos. El tubo así dispuesto tiene la forma representada en la Fig. 62.

La preparación de un tubo simple es exactamente la misma y está representada por la Fig. 63.

Siembra. — Tórnase la semilla, cualquiera que sea, en caldo esterilizado en un matraz Pasteur. Rómese la extremidad afilada de uno de los pequeños tubos laterales, se calienta á la llama su superficie exterior y se deja enfriar. Entonces se introduce esta extremidad afilada en el matraz y se aspira por la extremidad superior del tubo. Cuando en la rama gruesa del tubo se cree que hay bastante cantidad del líquido, se sopla por la parte superior del tubo para expulsar el líquido que puede quedar en el pequeño tubo y se cierra perfectamente á la lámpara la extremidad de éste.

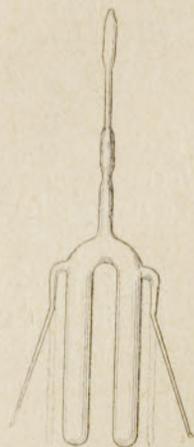


FIG. 62

Tubo doble de PASTEUR, modificado,
para cultivo de anaerobios.



FIG. 63

Tubo sencillo de PASTEUR, modificado,
para cultivo de anaerobios.

Cuando el tubo es doble, se verifica la misma operación para las dos ramas gruesas.

Procédese en seguida á la extracción del aire, para lo cual se emplea cualquiera de las máquinas para hacer el vacío. Durante las maniobras de esta operación y aplicando una pequeña llama de gas, se determina la ebullición á baja temperatura en las ramas del tubo.

Cuando se usa la trompa, se suspende por medio de un cauchuc grueso á la llave de tres agujeros el tubo simple ó doble que comunica además con la trompa y el gasómetro. Entonces se abre la comunicación con la trompa y se hace el vacío. Cuando éste está parcialmente hecho, se llena por dos ó tres veces el tubo con gas hidrógeno traído por medio de la trompa, y cuando el tubo está completamente privado de aire, se cierra á la lámpara la extremidad superior poniendo en la estufa el tubo de cultivo.

El cultivo en el gas inerte y empleando la máquina de mercurio, se efectúa de la manera siguiente: pónese el tubo doble ó sencillo en comunicación con la máquina neumática y se hace el vacío. Entonces se hace pasar el hidrógeno al tubo, se extrae el gas y se le hace pasar de nuevo á dicho tubo, cerrando por último su extremidad bajo la misma corriente del gas y llevándolo á la estufa.

Cultivo en las pipetas Pasteur. — Este procedimiento es muy sencillo y da excelentes resultados. Construída la pipeta según hemos indicado en otro lugar, se empuja el tapón de algodón hasta la estrangulación y se practica otra nueva estrangulación en la parte superior de este tapón. La pipeta resulta de la forma representada en la Fig. 64, debiendo tener cerrado su extremo inferior.

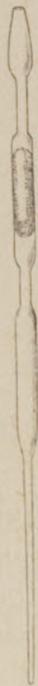


FIG. 64

Pipeta PASTEUR para cultivo de anaerobios.



FIG. 65

Pipeta PASTEUR, modificada, para cultivo de anaerobios.

Esterilizado el aparato, se emplea introduciendo la extremidad afilada de la pipeta en la llama, rompiéndola y sumergiéndola en el matraz que contenga la semilla. Entonces se aspira por su parte superior, haciendo que el líquido llegue hasta cerca del tapón pero sin tocar á él. En seguida se retira la pipeta y se cierra á la lámpara su extremidad superior. Adáptase en seguida á la máquina de vacío y se verifica éste en la misma forma que hemos indicado al tratar de los tubos. Terminada esta parte de la operación, se cierra herméticamente la parte superior del aparato y se lleva éste á la estufa en la forma representada por la Fig. 65.

Para practicar cultivos de anaerobios en grande escala, es preciso emplear otra técnica y diferentes aparatos.

M. Würtz da la descripción de un aparato sencillo, de ejecución fácil y que parece llenar todas las condiciones apetecibles. (Fig. 66.) Consiste en un frasco de un litro, con cuello ancho cerrado por un tapón de cauchuc y con dos orificios. Por este tapón pasan dos

tubos de cristal; uno de ellos llega hasta el fondo del frasco y el otro solamente hasta el cuello. Los dos tubos están encorvados: el primero termina por una afiladura muy fina; el segundo lleva dos estrangulaciones: la una en lo último de la curvatura y la otra cerca del orificio libre.

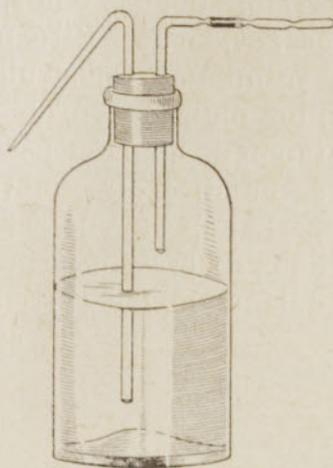


FIG. 66

Aparato de WURTZ para cultivos de anaerobios.

Para servirse de este aparato se le llena hasta su mitad de caldo y se le esteriliza en la autoclava á 115° durante 15 minutos. Cuando está frío, se siembra su contenido rompiendo la afiladura del primer tubo é introduciéndola en el tubo del cultivo que se quiera sembrar. Se aspiran algunas gotas, se cierra á la lámpara la afiladura y se hace el vacío en el frasco.

Antes de cerrar la afiladura se hará pasar el hidrógeno. Entonces se cierra igualmente á la lámpara la extremidad abierta del segundo tubo y se lleva el frasco á la estufa.