

PRÁCTICAS DE LABORATORIO PARA EL EXAMEN BACTERIOLÓGICO DEL AGUA¹

Por el Sr. CLYDE C. HAYS

Químico y Bacteriólogo de Waco, Texas

Pruebas en busca de bacterias.—El análisis del agua y aguas negras tiene por objeto determinar el número y naturaleza general del contenido bacteriano. No se trata de aislar e identificar todas las bacterias presentes, pues esto exigiría demasiado tiempo. La existencia del *B. coli*, que es un típico microorganismo intestinal, basta para indicar la contaminación del agua. Al tratar agua potable o aguas negras, la presencia o ausencia del *B. coli* constituyen una indicación de la purificación lograda en las distintas etapas del tratamiento.

Esterilización y desinfección.—Antes de tratar de estudiar las bacterias, precisa conocer los principios básicos de la esterilización y desinfección. Por desinfección se sobrentiende la destrucción de las bacterias patógenas únicamente, en tanto que la esterilización mata todos los organismos vivos. Los germicidas matan las bacterias, en tanto que los antisépticos sólo obstaculizan su desarrollo. Una substancia química puede obrar como antiséptico a una concentración dada, o solución de cierta potencia, y como esterilizador en otra.

Importancia de la esterilización.—El éxito de la bacteriología depende de mantener una técnica exacta, más o menos característica de esta ciencia. A fin de obtener resultados correctos, precisa impedir la contaminación por otros microorganismos, y de aquí que deban esterilizarse y manipularse con todo cuidado los medios y recipientes de cristal, así como los demás aparatos necesarios. Sin embargo, es muy difícil obtener la esterilización, y aún más difícil conservarla, debido a la existencia de bacterias en todas partes, como sucede en las manos, cubiertas de mesa, y en el polvo.

Inhibición del desarrollo.—Algunas substancias químicas, por ejemplo, cloroformo, tolueno, xileno, y timol, obran como preservativos, por inhibir o impedir la proliferación y reproducción de las bacterias. Estas substancias se denominan inhibidores, y se utilizan para la conservación de muestras que contienen substancias orgánicas, tales como las aguas negras, lodo, alimentos y tejidos animales.

Aparatos.—A fin de determinar la fórmula bacteriana total por cc, se emplean placas de Petri, para el cultivo y proliferación de las bacterias en el interior.

Tubos de ensayo: Los tubos de ensayo son tubos de cristal corriente, abiertos en la parte superior, y de fondo redondo. Cuando están bien

¹ Tomado de las Actas del Décimooctavo Curso Breve de Abastos de Agua de Texas, que se verificó en College Station, Texas, del 10 al 15 de febrero de 1936.

limpios y esterilizados, se utilizan para contener líquidos y medios bacterianos.

Tubos de fermentación: Los tubos de fermentación se utilizan para observar la formación de gas (gasogenia) producida por las bacterias. Algunos consisten en un bulbo abierto con un brazo lateral cerrado. Son caros, difíciles de limpiar, y frágiles. Por lo tanto, para el trabajo ordinario se recomienda un tubo recto, llamado de Durham, que resulta más satisfactorio.

Pipetas: Las pipetas son tubos de cristal graduados, abiertos en ambos extremos, y que se utilizan para depositar cantidades exactas de líquido.

Frascos de dilución: Las muestras de agua potable o aguas negras se diluyen en una botella grande o frasco de Erlenmyer, y deben tener capacidad suficiente para contener un volumen doble del del agua empleada.

Estufas de cultivo: En el fondo, las estufas de cultivo o incubadoras consisten en gabinetes aislados, y provistos de dispositivos para aplicar calor y regular cuidadosamente la temperatura del interior. Se emplean para conservar cultivos en condiciones ideales para la proliferación. Hay dos de uso corriente; una que mantiene una temperatura constante de 37 C, y la otra de 20 C. Para aplicar el calor pueden utilizarse gas, petróleo o electricidad. De ser necesario mantener una temperatura de 20 C, hay que utilizar un dispositivo que permita alternar la calefacción y el enfriamiento.

Esterilización de los aparatos.—La esterilización puede lograrse utilizando sustancias químicas, calor o filtración. El calor y las sustancias químicas matan las bacterias, en tanto que la filtración sólo las elimina mecánicamente.

Los filtros corrientes de piedra molida, arena, grava, cenizas, escorias, pavesas o cuentas de cristal, no eliminan las bacterias hasta el punto de esterilización, pero sí se obtiene ésta haciendo pasar el cultivo bacteriano por una placa de porcelana sin barniz.

Métodos sencillos para la esterilización con el calor: Esta puede obtenerse de tres modos: por el calor seco, por el calor húmedo, y con la llama, siendo los tres de uso corriente en el laboratorio.

Los objetos de cristal, pipetas, placas de Petri, y piezas de los aparatos se esterilizan mejor con el calor seco, para el cual se utiliza un esterilizador u horno de aire caliente, semejante a los hornos de las estufas de cocina. Las sustancias que van a esterilizarse se colocan en las parrillas del horno, y se calientan durante una hora a una temperatura de 150 a 180 C, la cual mata todas las bacterias y esporos, pero resulta demasiado intensa para las sustancias de origen vegetal o animal.

El método más satisfactorio para esterilizar sustancias que soportan la humedad y la presión, consiste en emplear un aparato llamado auto-

clave, manteniendo el vapor a una presión de 1.05 kg por cm² durante 15 minutos.

Medios de cultivo.—Empleo: Antes de identificar las bacterias, hay que cultivarlas en una substancia apropiada especialmente preparada para el objeto, y que se denomina medio de cultivo o simplemente medio.

Requisitos: Todos los medios de cultivo deben llenar los siguientes requisitos:

1. Deben contener humedad.
2. Deben contener un alimento apropiado para las bacterias dadas.
3. Su reacción debe ser neutra o ligeramente ácida. Este es un factor importantísimo y ocasiona muchas dificultades, pero utilizando un medio preparado, la reacción resulta correcta sin casi ninguna manipulación.
4. El medio no debe contener ninguna bacteria, y de aquí que haya que esterilizarlo, así como todo lo que se pone en contacto con él.
5. Debe haber oxígeno a la concentración apropiada.
6. El medio debe adaptarse a las peculiaridades de las bacterias que van a estudiarse, y debe contener, por lo tanto, azúcar, sangre o líquidos orgánicos, según sea necesario.
7. Hay que reproducir las condiciones naturales en que las bacterias se desarrollan mejor.

Medios preparados: El empleo de medios preparados, autorizado por las principales asociaciones, simplifica bastante su preparación. Pueden comprarse en estado sólido, y pesarse y disolverse en agua destilada cuando se necesiten. En todos los casos, la reacción de los medios preparados es correcta, sin ajuste, después de la esterilización en el autoclave.

Los medios que más se utilizan en la bacteriología del agua son los siguientes:

1. Caldo nutriente o sencillo.
2. Agar nutriente.
3. Agar—azul de metileno—eosina.
4. Agar de Endo.
5. Bilis—lactosa—peptona.
6. Medio citratado de Koser.

Pésese la cantidad apropiada del medio, disuélvase en 1 litro de agua destilada, y guárdese en tubos o frascos; esterilícense éstos calentándolos en el autoclave a una presión de 1.05 kg por cm² durante 20 minutos. Los medios son bastante estables, y pueden guardarse con seguridad en hielo durante dos o tres semanas.

Examen de ejemplares teñidos.—Para examinar al microscopio las muestras teñidas, procédase en esta forma:

1. Prepárese la muestra teñida en el portaobjetos, y cúbrase con la tapa.
2. Colóquese una gotita de aceite en la tapa.
3. Colóquese el portaobjetos en el centro de la platina.
4. Bájese el objetivo de baño en aceite, usando el graduador mayor, hasta que casi toque la gota de aceite.
5. Ajústense la abertura del diafragma y la inclinación del reflector de modo que la luz pase por el objetivo y el portaobjetos.

6. Colóquese el ojo sobre el ocular, y muévase suavemente hacia la derecha el delicado ajustador, con el pulgar y el índice de la mano derecha, hasta que aparezca el campo algo coloreado.

7. Con el pulgar y el índice de la mano derecha, manipúlese cuidadosamente el ajuste delicado, moviendo entre tanto suave y constantemente el portaobjetos con el pulgar e índice de la mano izquierda. El ajustador puede moverse lentamente hacia atrás y hacia adelante mientras se examina el portaobjetos, hasta descubrir la zona deseada del portaobjetos. Este debe asegurarse luego con las grapas de que está provista la platina para este objeto, y dejarse estacionario mientras se examina la muestra.

8. Una vez terminado el examen, quítese el objetivo y límpiase cuidadosamente con una tela de seda o papel para lentes, y colóquese en una caja para evitar cualquier daño.

Métodos de coloración.—Colorantes corrientes: Los colorantes se utilizan para hacer resaltar los detalles de la estructura bacteriana, y para facilitar el estudio de las bacterias. Aunque se han preparado muchos colorantes, algunos de los corrientes servirán para los fines ordinarios. Entre los que resultan más útiles figuran la fucsina-carbol diluída, o colorante de Ziehl-Neelsen; el azul de metileno alcalino, o colorante de Loeffler, y el de Gram.

La fucsina-carbol, o colorante de Ziehl-Neelsen, está compuesta de las siguientes sustancias: Solución alcohólica de fucsina básica, 10 cc; solución acuosa de ácido fénico, 1,000 cc.

El azul de metileno alcalino, o colorante de Loeffler, contiene las siguientes sustancias: Solución alcohólica saturada de azul de metileno, 30 cc; solución de hidrato de potasio al 2:10,000, 100 cc. La solución de hidrato de potasio al 1:10,000 se prepara agregando dos gotas de solución al 10:100 de hidrato de potasio a 100 cc de agua destilada.

El colorante de Gram consiste de dos soluciones: la solución 1, o de violeta de genciana, que se prepara mezclando 75 cc de agua de esencia de anilina con 25 cc de solución alcohólica saturada de violeta de genciana. El agua de esencia de anilina se prepara disolviendo 2 cc de esencia de anilina en 100 cc de agua destilada, agitando la solución y filtrando.

La 2, o solución yodada de Gram, se prepara mezclando 2 gm de yoduro de potasio, 1 gm de yodo, y 300 cc de agua destilada.

COLORACIÓN CON FUCSINA CARBÓLICA O AZUL DE METILENO ALCALINO

Para obtener resultados satisfactorios con la fucsina carbólica o el azul de metileno alcalino, deben observarse cuidadosamente las siguientes instrucciones:

Colóquese una pequeña cantidad del cultivo bacteriano en el cubreobjetos, y deséquese al aire o caliéntese ligeramente en el aire caliente encima de la llama de un mechero de Bunsen o de alcohol. Una vez evaporada la humedad, pásese lentamente el cubreobjetos a través de la llama de un mechero de Bunsen o lámpara de alcohol, haciendo así que la substancia se fije o adhiera firmemente al cristal. Aplíquense luego unas cuantas gotas del colorante, dejando reposar luego el cubreob-

jetos durante un período que varía según el colorante utilizado y el cultivo bacteriano. Lávese luego el exceso de colorante con agua destilada, y colóquese el cubreobjetos en el portaobjetos, empleando bálsamo de Canadá para asegurarlo. La muestra se examina primero con poco aumento, luego con mucho aumento, y por fin con inmersión en aceite.

Empleo del colorante de Gram.—El Gram es uno de los colorantes más importantes, y requiere bastante práctica para que rinda resultados satisfactorios. He aquí el procedimiento: Fijese una pequeña cantidad del cultivo bacteriano en el cubreobjetos, según se explicó antes, y tíñase con la solución de violeta de genciana y anilina durante $1\frac{1}{2}$ minutos. Lávese la muestra teñida con agua destilada, y aplíquese la solución yodada hasta que el cultivo bacteriano toma una coloración negra purpúrea, lo que exige aproximadamente $1\frac{1}{2}$ minutos. Algunas bacterias toman el colorante, y otras no. Para distinguir las bacterias teñidas, agréguese alcohol al 95:100, y déjese reposar durante 2 minutos, lo cual decolora el medio, pero no elimina el color de las bacterias teñidas. Lávese el cubreobjetos con agua destilada, séquese, y colóquese en el portaobjetos. Puede obtenerse un contraste bien demarcado utilizando la contracoloración con otro colorante, como el pardo de Bismarck.

Diferenciación con el Gram.—Las bacterias que toman una coloración violeta intensa con el Gram, se dice que son positivas al Gram, y las que no la toman, negativas al Gram. Algunas de las bacterias comunes positivas al Gram son: *B. anthracis*, *B. tuberculosis*, *B. subtilis*, *B. tetanus*, *B. aerogenes capsulatus*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus pyogenes*, *Pneumococcus*, *Micrococcus tetragenus*; y algunas de las negativas, el *B. typhosus*, *B. coli*, *B. dysenteriae*, *B. proteus*, *Spirillum cholerae*, *Meningococcus*, *Gonococcus*.

Análisis del Agua en Busca de Bacterias

EXPLICACIONES PRELIMINARES

Procedimiento.—El análisis del agua comprende dos partes: (a) determinación del total de bacterias, y (b) determinación del total de *B. coli*.

El procedimiento comprende las siguientes operaciones: obtención de muestras, fijación, incubación, cuento, e informe de los resultados. El cuento o numeración de las bacterias sólo reviste valor relativo, pues no existe ningún método para determinar el número absoluto; sin embargo, desde el punto de vista sanitario basta con conocer el número relativo de bacterias.

Colecta y almacenamiento de las muestras.—Guárdense las muestras de agua en un frasco limpio y esterilizado, con tapón de cristal, y con capacidad de 60 a 240 cc. Obténgase una muestra típica, y evítese la contaminación después de recogida. Las muestras no deben tomarse del grifo sino después de dejar salir toda el agua del tubo de servicio, ni de una bomba o hidrante hasta vaciar todas las conexiones. De tratarse de un lago o corriente, sumérgase el frasco debajo de la superficie, evitando que penetren substancias extrañas, como hojas o polvo de la superficie.

Inmediatamente después de llenar el frasco, tápese, cúbrase con tela, papel u hoja de estaño, y átese. Examínense las muestras lo más pronto posible después de recogidas, pues las bacterias proliferan rápidamente, sobre todo cuando se deja calentar el agua. Cuando resulta imposible examinarlas en el acto, manténganse a una temperatura inferior a 10 C.

Preparación de las diluciones.—Para el examen bacteriológico, la muestra se diluye casi siempre mezclando 1 cc con 9 o 99 cc de agua esterilizada del grifo. Esterilícese el agua del frasco de dilución en el autoclave, a una presión de 1.05 kg durante 15 minutos. Agítese luego fuertemente la muestra que va esterilizarse, y con una pipeta esterilizada tómesese 1 cc, y agréguese al frasco de dilución que contiene 9 o 99 cc de agua destilada. Mézclense bien, agitando, el agua de dilución y la muestra primitiva. En la misma forma pueden diluirse más el agua muy contaminada o las aguas negras. La intensidad de la dilución debe ser tal que rinda de 30 a 300 colonias bacterianas por cc, y su determinación se basa en la práctica.

Fijación.—De emplearse agar nutriente o gelatina licuados, con una pipeta esterilizada tómesese 1 cc de la muestra diluída y colóquese en un platillo de Petri esterilizado. Agréguese luego 10 cc del medio a la muestra, agitando cuidadosamente el contenido, inclinando el platillo de un lado a otro. Déjese luego enfriar el platillo y endurecer el agar, y colóquese en la incubadora. Al platillo de Petri se le llama con frecuencia placa, y al procedimiento fijación. Las placas de Endo o de agar EMB se preparan virtiendo primero el medio líquido en el platillo de Petri esterilizado, y dejándolo que solidifique, e inoculando luego raspando en la superficie las muestras con un asa de platino.

Prepárense las placas por duplicado. El medio se diluye demasiado si se emplea más de 1 cc de la muestra diluída, pues la mezcla resultante no se endurece al enfriarla.

Incubación.—Las placas de agar se incuban por lo general durante 24 horas a 37 C. La atmósfera de la incubadora debe ser oscura, húmeda y bien ventilada, y la temperatura constante. Si la temperatura es de 20 C, la incubación debe durar 48 horas.

Después de la inoculación, incúbense todas las placas de gelatina a 20 C, lo que exige un período mayor de incubación, por lo común de 48 horas. Los tubos de ensayo y las placas se guardan cinco días, para determinar la facultad solidificante de las bacterias.

FÓRMULA BACTERIANA

Cuento de bacterias.—Después de inocular las bacterias en un medio sólido, y de incubarlas, se multiplican con suma rapidez, de modo que a las 24 horas de incubación, la prole de cada una de las bacterias forma una colonia de muchos miles, que puede descubrirse con facilidad a la

simple vista. Lo que se trata de contar son las colonias, y no las bacterias primitivas.

Para facilitar el cuento de las bacterias, se divide la placa en secciones, de cuartos u octavos de toda la superficie. Cuéntense las colonias de unas cuantas secciones, obténgase el promedio, y multiplíquese el resultado por el total de secciones de la placa. Por cuento bacteriano se sobrentiende el número de bacterias por cc.

Informe de los resultados.—Los errores inherentes a la obtención de muestras, fijación y recuento, convierten en falso y erróneo cualquier intento de tabulación correcta, y para evitar error en el cómputo utilícese la tabla que aparece en la obra "A. P. H. S. Standard Methods."

PESQUISA DEL B. COLI

Pruebas para determinar la presencia de B. coli.—Todos los bacilos anesporógenos positivos al Gram, que fermentan la lactosa con formación de gas, y proliferan en los medios ordinarios en presencia de oxígeno libre, se clasifican como miembros del grupo coliaerógeno. Existen métodos para diferenciar el *B. coli* fecal del no fecal o aerógeno, pero por lo general no se emplean en el análisis corriente del agua, pues la existencia de cualquiera de los dos basta para que sea sospechoso el abasto de agua. La prueba completa comprende tres partes: (a) la presuntiva; (b) la confirmada parcialmente, y (c) la confirmada o completa.

Prueba presuntiva.—Para verificar esta prueba, esterilícense algunos tubos de fermentación que contengan caldo de lactosa, e inocúlense luego con una cantidad conocida del agua a analizar. Incúbense los tubos durante 24 horas a 37 C, y obsérvense en busca de gas. Por lo común se emplean cinco tubos, introduciendo en cada uno una cantidad distinta de agua: 10 cc; 1 cc, y 0.1 cc. Los tubos deben contener cuando menos doble cantidad de caldo de lactosa que de la muestra.

Si el gas formado después de incubar durante 24 horas ocupa 19% o más del brazo cerrado del tubo de fermentación, se considera como positiva la prueba presuntiva para el *B. coli*. Si el gas formado no llega a 10%, o no existe ninguno, la prueba se considera dudosa, y los tubos deben colocarse en la incubadora otras 24 horas; de existir algún gas, pero menos de 10% al terminar la incubación adicional, la prueba se considera "dudosa." La falta absoluta de gas después de 48 horas de incubación, constituye una "prueba negativa."

Basta con la prueba presuntiva cuando resulta definitivamente positiva o negativa, pero de resultar dudosa, hay que confirmarla. Sin embargo, en campaña, o en casos de emergencia o desastres, no es necesario completarla, y puede informarse que el agua "no es segura" cuando se observa gasogenia dentro de 24 horas en los tubos de fermentación con caldo-lactosa.

Prueba parcialmente confirmada.—Si el cultivo de un tubo de fermentación que revela gasogenia se raspa en agar EMB o medio de Endo, y después de 18 a 24 horas de incubación aparecen colonias semejantes al grupo *B. coli*, la prueba queda parcialmente confirmada. Puede apresurarse la prueba raspando las placas poco después de aparecer el gas en los tubos de fermentación. Para esta prueba debe utilizarse únicamente el tubo que revela menos gasogenia al terminar

el período normal de incubación, pues sólo los casos dudosos necesitan más confirmación.

Cuando las colonias resultan atípicas, es decir, que no son típicas del grupo, la prueba se considera dudosa y no negativa, y hay que completar los resultados con una observación más prolongada. Algunos miembros del grupo proliferan a veces con lentitud.

Prueba confirmada o completa.—La prueba completa resulta necesaria siempre que sean dudosos los resultados de la prueba parcialmente confirmada, y se practica utilizando la dilución más baja que revele gasogenia en el caldo-lactosa.

Prepárense un medio inclinado de agar nutritivo y un tubo de fermentación con caldo-lactosa, e inocúlense con colonias típicas de una placa dudosa, utilizando un asa de platino esterilizada. Incúbese el tubo de fermentación por lo menos durante 48 horas y obsérvese la gasogenia; examínese al microscopio el cultivo en la placa inclinada de agar. La gasogenia en el tubo de fermentación y la existencia de bacilos anesporógenos negativos al Gram en un cultivo gasógeno, constituyen pruebas "positivas" de la existencia del grupo coliaerógeno.

De no observarse colonias típicas, incúbese la placa dudosa durante 24 horas más, y recójense e inocúlense en tubos de fermentación las colonias más típicas. La prueba se considera negativa de no haber gasogenia, o no comprobarse que los bacilos sean negativos al Gram y anesporógenos.

ORGANIZACIÓN DE UNA CLÍNICA OFTALMOLÓGICA¹

Por el Dr. H. ARRUGA

Es esta conferencia, trataré del ménage por así decir, oftalmológico, refiriéndome a lo relacionado con la técnica de la consulta diaria, al instrumental y a la iluminación relacionadas con la clínica y cirugía ocular.

Organización del trabajo en las clínicas: Este debe obedecer siempre a un plan, tal como lo hago en mi clínica particular, resultado y fruto de la observación realizada en mis visitas a otras clínicas. Las visitas a distintos servicios oftalmológicos enseñan siempre mucho, pues se toma de ellos lo que conviene, dejando lo que no interesa. Es un peligro hacerse una oftalmología propia, y en aquella forma se ven errores que cometemos a diario y que cometen los demás, de modo que el cambio de ideas resultante es enormemente beneficioso. Lo puedo decir de mí, que constantemente trato de perfeccionarme y corregir mis defectos. Por más que el talento y el estudio compensen muchas de las deficiencias en que a veces se actúa, es necesario además, paciencia para rendir trabajo en calidad y en cantidad.

En cuanto a clínicas particulares se impone clasificarlas en clínicas de clientela numerosa y de clientela reducida. Esta impone todo el

¹ Tomado de la *Revista Oto-Neuro-Oftalmológica*, eno. 1937, p. 8.