

LA INDUSTRIA LECHERA

NOTAS DE CLASE

(Continuación)

I

MICROORGANISMOS EN LA LECHE

Hiphomicetos.—Dentro de la gran agrupación de los hiphomicetos, estudiados detenidamente en los cursos de Botánica y Patología Vegetal, se encuentran las *mucedíneas*, de interés especial para la Industria lechera, por el rol que desempeñan, principalmente en la elaboración de los quesos.

Estas mucadíneas, visibles al ojo desnudo, se presentan bajo forma de una capa blanca, que más tarde conservan ese color ó adquieren tintes verdosos, azulados, grisáceos, etc., más ó menos intensos, por los pigmentos que se desarrollan al momento de la esporulación.

La multiplicación de estos organismos se origina por alargamiento de sus filamentos, llamados *hifas*, los que ramificándose constituyen el *micelium* y de los cuales, algunos resultando fructíferos, dan lugar á esporas ó *conidios*.

Las mucadíneas poseen, por carácter esencial, la particularidad de desarrollarse en medios húmedos, y constituyen fuertes agentes de combustión; así la capa con que se cubre los líquidos, absorbe el oxígeno á su pasaje del exterior, facilitando el desarrollo de los microbios anaerobios.

Queman las materias hidrocarbonadas, con producción de anhídrido carbónico y agua: transforman las materias azoadas y en la leche operan su coagulación (*oidium lactis*); oxidan la caseína y originan los productos de su degradación: leucina, tirocina, urea, sales amoniacaes, etc., (*penicillium*, *aspergillus*, *mucor*).

Se comprende, pues, que estos seres tan conocidos bajo el nombre de moho, pueden ser muy bien, tanto útiles como nocivos para la leche y sus derivados.

Los principales géneros, de cuyo detalle hemos de ocuparnos más adelante, comprende:

- a) *Oidium*.—Constituidos por un micelium cuyas hifas, se disocian en artículos cortos;—presenta una variedad interesante en lechería: el *oidium lactis*.
- b) *Penicilium*.—Hifas fructíferas terminando en pincel pedunculado, desarrollándose en sus extremidades, las cadenas de esporas: dos variedades importantes: *glausa* y *caudiduns*.
- c) *Aspergillus*.—Hifas fructíferas terminados en mazo, sobre las que nacen prolongaciones llamadas *sterigmatos*, portadores de esporas—variedad importante: *Sterigmatocytis nigra*.
- d) *Mucor*.—Hifas fructíferas terminadas por un *esporangio*, que contiene las esporas; aquel en su madurez estalla y pone á estos últimos en libertad; variedad interesante: *mucor mucedo*.

II

CULTIVO DE LOS MICROBIOS

Como lo ha establecido Pasteur, no hay otra manera posible de estudiar las condiciones biológicas y las propiedades fisiológicas de los microbios, que su cultivo en medios nutritivos artificiales, y obtener *cultivos puros* de la especie que se procura investigar.

Esto nos obliga á un breve detalle de los procedimientos generales de cultivo, antes de entrar en la descripción de los microorganismos propios á la leche, y en cuya parte mencionaremos los métodos especiales que reclaman determinados microbios.

Medios de cultivo.—Comprenden dos grandes divisiones *medios líquidos y medios sólidos*. Los primeros, impuestos desde un principio, por el hecho mismo de haberse constatado la presencia abundante de bacterideos en las infusiones orgánicas, tienen aun gran importancia para procurarse material microbiano. Los segundos, permiten delimitar mejor las colonias de cada especie y disponer de un medio de caracterización por el aspecto y forma que adquieren esas colonias en estos cultivos, siendo, pues, más apropiados para conseguir el aislamiento de las especies.

Medios líquidos.—Dentro de los numerosos líquidos preconizados, citaremos los más usuales:

Líquido mineral.—De escasa aplicación para los bacterios, pudiendo emplearse con ventaja en el cultivo de mucédinea.

Agua destilada.....	1000	gramos
Glicerina.	30 á 40	»
Lactato de amoníaco	7	»
Cloruro de sodio.....	3 á 5	»
» » calcio.....	0.20	»
Fosfato bibásico.....	2	»
Sulfato de magnesia ...	0.25	»
» » fierro	0.10	»

Caldo de Loeffler—Se toman 500 gramos de carne de buey, sin grasa ni tendones, que se pican en pedacitos menudos; se ponen á macerar con un litro de agua destilada, en lugar fresco, durante 24 horas, luego se filtran al través de un lienzo y exprime fuertemente por medio de una prensa de carne.

El líquido así recogido, se completa á 1000 gramos con agua destilada; se le agrega 5 gramos de cloruro de sodio y 20 á 25 gramos de peptona seca, y haciéndolo hervir durante una hora para precipitar los albuminoideos, se procede nuevamente á la filtración, primero sobre lienzo muy fino y luego en papel de filtro.

En tales condiciones el líquido presenta una fuerte reacción ácida que es nociva para el desarrollo de la mayor parte de los bacterios y por lo tanto se procede á su neutralización hasta obtener una ligera alcalinidad, con la agregación gota á gota de una solución de bicarbonato de soda, lo que se comprueba por la reacción de tornasol. Se hace hervir durante un cuarto de hora, se deja en reposo hasta el día siguiente: luego se decanta, separando la materia grasa y las sales que se habrán precipitado, obteniéndose un líquido bien claro, de color ambar, que se lleva á un matríz previamente esterilizado y tapado con algodón para esterilizarlo en autoclave durante media hora, á la temperatura de 115 á 120° centígrados.

Para emplear, este caldo, se reparte por medio de la pipeta distribuidora Chamberland ó Roux, etc., en tubos de ensayo, de Pasteur, de Roux, vasos Erbenmeyer esterilizados á dosis que representan aproximadamente el tercio del volúmen de esos tubos ó vasos y es en estos donde se hace directamente la siembra de los microbios.

Antes de emplear el caldo de cultivo, debe tenerse la precaución de someterlo á la estufa de incubación por 48 á 60 horas, á fin de constatar su buen estado de asepsia, y ello se prueba, según que el líquido se conserve transparente ó se vuelva turbio, en este último caso, ha habido infección y no conviene para el cultivo.

Caldo peptonizado.—Se prepara en la siguiente fórmula:

Agua destilada ó hervida.....	100	gramos
Peptona seca	1	"
Cloruro de sodio.....	0.05	"
Gelatina.	2	"

Leche.—Se emplea el suero ó la leche fresca, y se neutraliza si fuera ácido hasta presentar ligera reacción alcalina; luego se coloca en matraces esterilizados tapados con algodón, que se somete á los procedimientos de esterilización, para tenerla en perfectas condiciones de asepsia.

Medios sólidos.—Dentro de esta categoría, se comprenden los siguientes preparados más importantes.

Gelatina-peptona.—Se prepara con el caldo de Loeffler, ó simple caldo de buey, agregándose de 10 á 18 % de gelatina, (menor cantidad en invierno y mayor en verano) extra fina, marca llamada dorado, que ha sido previamente divididas en pequeños trozos y fundida lentamente al baño maría.

Como este preparado presenta generalmente reacción ácida, se le neutraliza en solución de carbonato de soda, vertido gota á gota hasta conseguir ligera alcalinización y en seguida se le filtra. Esta filtración se opera muy lentamente, por la viscosidad de la gelatina y para activarla, evitando su solidificación prematura, se emplean filtros ó embudos de filtración caliente, con el recurso de papel de filtrar, blanco de huevo, negro animal, etc., á fin de obtenerlo bien limpio.

Obtenida en esa forma la gelatina-peptona, se distribuye en matraces ó tubos de ensayo, tapado con algodón según sea para conservarla ó usarla en seguida, y se llevan á la esterilización en auto-claves estufas á vapor de Koch etc., de manera que dicha esterilización se efectúe en tres veces con intervalo de 24 horas, al vapor húmedo y á temperaturas vecinas de 100° centígrados, á fin de evitar que por la fuerte elevación de temperatura y esterilización seca, pierda sus propiedades de tornarse en jalea sóida y compacta.

Gelosa nutritiva ó Agar-agar.—Como la gelatina-peptona se vuelve líquida, á temperaturas de 20° á 24° según la proporción de gelatina, presenta serios inconvenientes para cultivos, cuyas temperaturas óptimas oxilan entre 30° y 38°. Este inconveniente se subsana recurriendo á la gelosa nutritiva.

Este medio de cultivo se obtiene con el *agar-agar*, producto desecado del alg. marina *Gelidium spiriforme*, que contiene una materia gelatinosa muy abundante, llamada

Gelosa, por Payen, el comercio la expende en tabletas largas, delgadas y estrechas, de aspecto córneo y quebradizo; sus propiedades son de hincharse y disolverse en agua caliente, y de solidificar por enfriamiento quinientas veces su peso de agua, ó sea diez veces más que la mejor gelatina.

Los dos mejores procedimientos para la preparación de este medio de cultivo, son:

De Macé.—Se hace macerar durante 24 horas en invierno y 12 en verano, 25 gramos de agar-agar en medio litro de agua acidulada con ácido clorhídrico al 6 %, cuidando de remover varias veces; al cabo de un tiempo, la gelosa (agar-agar) que se ha hinchado considerablemente, se lava á grandes aguas y repetidas veces;—se vuelve á poner en maceración por igual término que para la anterior, en medio litro de agua con 5 % de amoníaco y se lava igualmente en varias aguas dejándola escurrir.

La gelosa así tratada, puede mezclarse con agua destilada ó con caldo de Loeffler:—En el primer caso, inmediatamente de lavada y escurrida el agua amoniacada, se le agrega 1 litro de agua destilada en plena ebullición y una vez disuelta la gelosa se añade 50 gramos de agua conteniendo 10 á 15 gramos de peptona seca; se neutraliza con solución saturada de bicarbonato de soda, se pasa por franela y se filtra en caliente;—luego se distribuyen en tubos y se esterilizan al auto-clave.

En el segundo caso, inmediatamente de lavada el agua amoniacada se agrega 1 litro de caldo de Loeffler calentada á fuego desnudo; una vez disuelta la gelosa, se neutraliza con solución saturada de bicarbonato de soda, se pasa por franela, filtra en caliente y se reparte en tubos de ensayo tapados con algodón para esterilizarla al auto-clave durante media hora y á 115-120° centígrados.

De Roux.—A 1 litro de caldo peptonizado y neutralizado, se agregan 150 gramos de agar-agar cortado en pe-

queños trozos; se calienta una hora á 100° agitando amenudo; luego se tamiza sobre muselina y cuando la temperatura ha descendido á 70°-75° se le mezcla intimamente una clara de huevo.

Ensayada la reacción y modificándola por solución concentrada de bicarbonato, si en caso fuera ácido, se vuelve á calentar á 100° durante 45 minutos, se filtra en caliente y se distribuye en tubos que se neutralizan al auto-clave por media hora y temperatura de 115°-120°.

La gelosa nutritiva, se conserva al estado sólido hasta 70°-75° y se licua completamente á 85°-90°; si esto constituye una ventaja como lo hemos dicho, para cultivo, que exigen temperaturas óptimas mayores de 30°, en cambio, impide el *cultivo sobre placas* para la disociación de las diversas especies bacterideanas, y en este caso, la gelatina-peptona ofrece grandes ventajas.

Papas cocidas.—Se eligen tubérculos bien constituídos y sanos, preferentemente de variedades blancas, un poco harinosas y de tejido poco denso.

Se comienza por lavarlas convenientemente, frotando la piel para extraer toda adherencia, en seguida se envuelve en un lienzo y se llevan al auto-clave durante tres cuartos á una hora, con temperatura de 150°-120°; inmediatamente de enfriadas, se pelan, estirpan los ojos, nudosidades, puntos negros, etc., y por medio de un saca-bocado especial para papas, se les divide en varios medios cilindros: cada medio cilindro, se introduce en un tubo de Roux y se lleva á la esterilización durante 15 á 25 minutos, según el grado de cocción que haya recibido anteriormente.

Procedimientos de cultivo.—Establecidos los principales medios nutritivos de que se hace uso en bacteriología, es indispensable conocer los procedimientos empleados y el *modus operandi*.

Cultivo en vasos.—Se emplean comunmente en las investigaciones encaminadas á estudiar las particularidades de desarrollo de especies puras, perfectamente aisladas.

Los más conocidos y de uso muy frecuente, son los tubos de ensayo de 0.^m015 á 0.^m02 de diámetro, munidos de un tapón de algodón hidrófilo y también se recurre á tubos especiales, (de Pasteur y Roux) vasos de Erbenmeyer y matraces, según la aplicación que vamos á indicar.

Los tubos de ensayo, sirven especialmente para los cultivos en medio sólido y se preparan esterilizándolos previamente con su tapón de algodón, en estufas á aire caliente con temperatura de 150°;—luego, se llenan á un tercio de su capacidad ó sea aproximadamente 10 centímetros con el medio nutritivo fundido, sea á mano y sirviéndose de un embudo calentado á la ebullición, cuidando que la masa no corra por las paredes y dificulte las operaciones ulteriores; se tapan con el mismo algodón hidrófilo que no esté ni demasiado cerrado ni demasiado suelto y puesto á la esterilización del vapor en auto-clave. durante media hora á 120°;—para aumentar la superficie libre de la gelatina ó e medio nutritivo que se emplea, se colocan los tubos, conforme se sacan del auto-clave, de manera á estar inclinados y presentar al cultivo, un bisel alargado pero que no llegue á tocar el tapón de algodón; enfriados los tubos, están en condiciones de ser empleados y para su conservación se les guarda en un vaso de vidrio cerrado por una cubierta; conviniendo recubrirlos de una pequeña capucha de cau-chú, á fin de evitar la evaporación rápida del medio nutritivo.

Los tubos de Pasteur y de Roux, figura 1, figura 2, están provistos de un estrangulamiento *a* cerca de la extremidad superior, y de un alargamiento en pipeta lateral *b* terminado en punto cerrado, y sirven especialmente para el cultivo en medios líquidos.

Para prepararlas, se introduce un tapón de algodón hasta el estrangulamiento *a* y se les lleva á esterilización en vaso bajo temperatura de 150° durante 1 á 2 horas; verificado el enfriamiento se corta por un golpe de lima la extremidad de la pipeta y se hace penetrar el medio nutritivo lí-

quido, aspirando por el cuello superior hasta llenar la tercera parte de su capacidad ó la cantidad requerida según el caso, é inmediatamente se cierra la pipeta aplicándola á la llama.

El matraz Pasteur, fig. 3, así como el vaso Erlenmeyer, fig. 4, y matraz á pipeta Chamberland, fig. 5, se emplean esencialmente para cultivos en medios líquidos. En las dos primeras, se usa el mismo procedimiento de esterilización indicado en los tubos de ensayo, provistos de sus correspondientes tapones de algodón, y una vez enfriados se llenan al tercio con el líquido nutritivo y para mayor precaución vuelven á esterilizarse antes de ser sembradas con los microbios.

Para el matraz á pipeta Chamberland, se procede en la forma indicada para los tubos Pasteur y Roux, y se introduce el líquido nutritivo, calentando el matrás y cortando la extremidad de la pipeta hasta obtener el tercio de su volumen, luego se cierra á la llama la extremidad de la pipeta, como se ha dicho para aquéllos.

La siembra en los cultivos, se practica comunmente con un hilo fuerte de platino, largo de 5 á 6 centímetros, fijado á una varilla de vidrio enrojado al fuego; la extremidad libre del platino puede ser recta, encorvada en crochét ó en asa simple y doble, según la cantidad que se necesita sembrar; cuando se recojen las muestras en estudios bacteriológicos en pipetas ó ampollas, estas mismas sirven para la siembra.

Cuando se emplea la varilla de platino, esta debe ser esterilizada á la llama antes y después de cada aplicación, procediéndose á la siembra en la siguiente forma después de haber recogido la partícula á sembrar; sea agitando el líquido, sea frotando una parte de masa sólida, según el tubo de una ú otra clase de cuerpo contaminado por los microbios que se van á cultivar.

1º Para la siembra en medio nutritivo líquido, se destapa el vaso ó tubo que lo contiene y se introduce la varilla agi-

tando la masa para operar la distribución regular de la infección microbiana; inmediatamente se repone el tapón de algodón para impedir una contaminación del exterior.

2º Para la siembra en medios sólidos (gelatina, gelosa), se frota á su superficie con la extremidad infeccionada de la varilla de platino, ó se procede por picadura, introduciéndola verticalmente en el substratum, ó también trazando una ó varias estrias sobre la superficie del medio nutritivo; esta última siembra, es más propia, en las casas de haberse mantenido los tubos con una cierta inclinación para formar en bisel la superficie del medio nutritivo; en todos los casos, durante la operación de la siembra, conviene mantener el tubo de ensayo, con la abertura hacia abajo, para disminuir el peligro de contaminación por el aire.

La siembra con pipetas, se practica, esterilizando á la llama, previamente una de sus estremidades; en seguida de enfriada se quiebra con una pinza también esterilizada apareciendo una gota de la materia á sembrar y esta se reparte en el medio nutritivo en la misma forma indicada para la varilla de platino.

En los medios nutritivos de gelatina-peptona, la siembra puede hacerse manteniendo la gelatina al estado líquido por calentamiento. á 20°, en este caso, se vierten 2 ó 3 gotas de la sustancia á sembrar, y se agita suavemente el tubo de cultivo, inclinándola sucesivamente de un extremo á otro, para conseguir una buena repartición; luego se deja solidificar nuevamente la gelatina, manteniendo el tubo inclinado.

Todos estos procedimientos son propios para los microbios aerobios, debiendo ser en otra forma para los cultivos anaerobios, lo que sería tratado más adelante.

En los tubos de cultivo de Pasteur y de Roux, así como en el matraz á pipeta de Chamberland, la siembra se efectúa quebrando la extremidad de la pipeta y haciendo penetrar por aspiración un poco del líquido contaminado; después se cierra á la llama.

Cultivos sobre células de vidrio.—Se recurre á este procedimiento para estudiar bajo el campo del microscopio, la evolución de los microbios durante un tiempo bastante largo, sin contrariar sus condiciones de vida. Pueden emplearse, porta-objetos, células de vidrio ó cámaras de Ranvier.

Los porta-objetos están provistos de una concavidad en forma de celdilla, y se preparan depositando una gota del líquido sembrado en un cubre-objeto, que luego se aplica sobre aquel, de manera que la gota quede vuelta hácia la concavidad del porta-objeto; la operación se termina fijando con parafina, todos los bordes del cubre-objeto; se comprende bien que tanto el porta como el cubre-objeto, han debido ser previamente esterilizados. lo que se consigue pasándolos por la llama ó en alcohol á 95°.

Las células de vidrio fig. 6, consisten en un anillo de vidrio *c* fijado con bálsamo de Cánada sobre un porta-objeto *a*, de manera á formar una cavidad que luego se recubre con una lámina (cubre-objeto) *b* untada de vaselina para evitar la penetración del aire ó impedir así la posible contaminación exterior.

El cultivo se practica después de esterilizado el porta, cubre-objeto y el anillo de vidrio, por la llama ó el alcohol á 95° y fijado el anillo sobre la placa de vidrio, depositando en el fondo de la cavidad una gota de agua pura y una gota del caldo nutritivo sobre la cara inferior del cubre-objeto de manera á quedar suspendida, una vez que se recubre el anillo como lo indica la fig. 6; la siembra se hace por medio de un hilo de platino previamente esterilizado y enfriado, con una pequeñísima parte del material á sembrar que se pasa á la gota del caldo nutritivo; para facilitar el examen microscópico aproximando al cubre-objeto los microbios de cultivo, conviene primero estender la materia de inoculación y secarla ligeramente, agregando luego las gotas del líquido nutritivo. Para evitar la desecación las células de vidrio, se mantienen en una pequeña cámara húmeda.

La cámara húmeda de Ranvier fig. 7, está constituida por un porta-objeto *a*, provisto de una ranura circular *b* y un disco *c* cuyo plano es algo inferior al borde superior del porta-objeto para formar así una cavidad que se recubre con un cubre-objeto *d*. Se coloca una gota de agua esterilizada en la ranura circular *b* y la gota del líquido nutritivo con la siembra en el disco *c*, y se cubre con la lámina *d* que se fija al porta-objeto por medio de parafina.

Cultivo sobre placas.—Este método establecido por Koch, tiene por objeto conseguir la mayor diseminación de los microbios, en gelatina licuada á baja temperatura de manera á formar su desarrollo aisladamente una vez aquellas solidificadas.

La gelatina destinada á este procedimiento de cultura debe prepararse sin agregar ninguna cantidad de sal ni azúcar, por los cristales que se formarían al desecarse la capa de jaléa, lo que dificultaría grandemente la observación y en cuanto á la preparación de gelatina seca, será modificada según las estaciones de manera que la coagulación pueda conseguirse á temperaturas bastante bajas,

Preparados varios tubos de ensayos con gelatina, en la forma indicada anteriormente (cultivos en vaso), se imergen en agua á 40° hasta fundir completamente la jaléa, luego se baja la temperatura á 30° por agregación de agua fría y se siembra el material sea por medio de pipeta ó alambre de platino esterilizados, por cantidades de dos á tres gotas, en un primer tubo que se marca con el número 1 y constituye la *primer dilución*; se agita suavemente el tubo de ensayo para repartir la inoculación en toda la masa; se toma de esta una ó varias gotas y se siembran de la misma manera en otro tubo de ensayo que se marca con el número 2, para constituir la *segunda dilución* y finalmente se toman otras tantas gotas de esta dilución y se siembran en un tercer tubo marcado con el número 3, para hacer la *tercer dilución* ó se prosiguen dos ó tres veces diluciones á fin de conseguir las más estendidas cuando el tenor en microbios es muy elevado.

Los tubos así sembrados, se dejan por algunos minutos en agua templada á 25°, para que la masa adquiera esa temperatura y entonces la gelatina se vierte sobre placas. Estas placas de vidrio deben tener una dimensión igual al doble de la distancia que existe entre el centro de la platina y la base de la columna del microscopio á fin de que pueda explorarse en toda su extensión.

Para la esterilización de las placas, antes de usarse conviene encerrarlas en una caja de tole especial y dentro de ellas se llevan á la estufa de aire caliente donde se someten á una temperatura de 150° durante 1 1/2 á 2 horas. Se retiran de la caja, una á una, á medida que se las emplea, por medio de una pinza esterilizada á la llama, ó cuando no se dispone de esos elementos, las placas pueden esterilizarse directamente á la llama. Una vez enfriadas estas placas, se vierte la gelatina de los tubos sembrados, de manera á repartirla en capa uniforme, para cuyo efecto dichas placas deben mantenerse perfectamente horizontales, y si la temperatura fuera demasiado alta ó baja, es necesario disponer del aparato á placas de Roux fig. 8. ó de la mesa de Ogier, etc., donde puede aumentarse ó disminuirse la temperatura por corrientes de agua caliente y fría, y mantener las placas perfectamente horizontales por medio de nivel y tornillos de precisión.

Cada placa llevará una etiqueta con el número de orden correspondiente á la dilución y estas se disponen en cristalizadores cubiertos, perfectamente esterilizados, manteniendo una cierta humedad por medio de un tapón de algodón embebido de agua hervida.

La temperatura favorable para el cultivo sobre placas, es de 18 á 19° y si hubieran muchas variaciones, se hará uso de una estufa de cultivo.

Un otro procedimiento más simple y que sustituye al cultivo sobre placas, consiste en practicar la siembra en el agua de condensación de los tubos de ensayo preparados con gelosa, poniéndolos inclinados en sentido opuesto al

bisel del agar-agar, para que dicha agua de condensación se acumule á la extremidad y luego se hace correr sobre todo el bisel para así obtener una buena dilución, También, las placas, se sustituyen por recipientes huecos, conocidos bajo el nombre de *cápsulas de Petry*.

Cultivo de anaerobios.—Hemos visto que estos microbios solo viven en ausencia de oxígeno libre (los absolutos) y consecuentemente los métodos de cultivo deben consultar esa exigencia, realizándose en ausencia del aire ó en presencia de otros gases inertes hidrógeno, anhídrido carbónico.

Los tubos Pasteur y Roux, fig. 1 y 2, pueden utilizarse perfectamente para este objeto, poniendo en comunicación la abertura superior con una máquina neumática y después de operado el vacío se soldará á la lámpara en el punto de su estrangulamiento.

El tubo á dos ranuras Pasteur fig. 9, para cultivos líquidos, da excelentes resultados en los anaerobios, siguiendo el procedimiento Roux, á saber:

Por medio de las pipetas laterales se introduce líquido nutritivo sembrado en una de las ramas, y líquido puro en la otra; ciérranse á la llama; se hace el vacío poniendo en comunicación con una bomba uno de los robinetes superiores, y se hace penetrar por el otro, un gas inerte ó simplemente se mantiene el vacío; se funde el tubo en *a* para cerrarlo herméticamente y para obtener un segundo cultivo basta introducir la rama sembrada de manera que caigan una ó dos gotas en la rama conteniendo el líquido nutritivo puro, y sin temor del aire.

En la fig. 10, se muestra otro tubo de Roux, más propio que el indicado en la fig. 2, para el cultivo de microbios anaerobios en medio gelatinoso ó geloso; el tubo *a* muestra el cultivo sembrado antes de producido el vacío y el tubo *a* después de originado aquel y con las soldaduras practicadas por la llama en la pipeta por el estrangulamiento *b* y en la abertura superior.

Finalmente haciendo uso del aparato Treteof fig. 11, pueden cultivarse los anaerobios en tubos de ensayo con medio nutritivo de gelatina ó gelosa, bastando para ello, licuar el substratum y hacer la siembra por pipeta ó varilla de platino, agitarlo suavemente para la dilución de la infección; solidificar el medio y colocar los tubos dentro del aparato en la forma que lo indica la figura, practicando en seguida el vacío por aplicación de una bomba al tubo *a*; también es posible la siembra en picadura ó estrias, producir la infección en el medio nutritivo al estado sólido.

R. J. HUERGO.

Nota: Las láminas aparecerán en el próximo número.

CONSTRUCCIONES RURALES

COCINA DE CAMPO

El que ha penetrado una vez en la *cocina* de uno de nuestros establecimientos rurales, debe haber experimentado una sensación tal, que muy pronto ha procurado huir hácia afuera en busca de aire respirable. La atmósfera es allí tan espesa, que no se puede distinguir á cinco metros de distancia á causa del humo que despide la *leña de oveja*, que es el combustible habitual.

Si se exceptúan dos puertas (que son las únicas aberturas que existen generalmente) no hay otras más en la cocina que un agujero en el techo para que salga el humo. Parece que el hacer algunas ventanas fuera operación muy costosa en nuestra campaña.

El *cocinero* es un mártir obligado á vivir en aquel ambiente irrespirable y sus ojos llorosos constantemente, indican bien á las claras que las glándulas secretoras de las lá-