

www.e-rara.ch

La estación zoológica de Nápoles, y sus procedimientos para el examen microscópico

**Castellarnau, Joaquín María de
Madrid, 1885**

ETH-Bibliothek Zürich

Persistent Link: <https://doi.org/10.3931/e-rara-107309>

Segunda parte. Procedimientos para el examen microscòpico y conservación de los animales.

www.e-rara.ch

Die Plattform e-rara.ch macht die in Schweizer Bibliotheken vorhandenen Drucke online verfügbar. Das Spektrum reicht von Büchern über Karten bis zu illustrierten Materialien – von den Anfängen des Buchdrucks bis ins 20. Jahrhundert.

e-rara.ch provides online access to rare books available in Swiss libraries. The holdings extend from books and maps to illustrated material – from the beginnings of printing to the 20th century.

e-rara.ch met en ligne des reproductions numériques d'imprimés conservés dans les bibliothèques de Suisse. L'éventail va des livres aux documents iconographiques en passant par les cartes – des débuts de l'imprimerie jusqu'au 20e siècle.

e-rara.ch mette a disposizione in rete le edizioni antiche conservate nelle biblioteche svizzere. La collezione comprende libri, carte geografiche e materiale illustrato che risalgono agli inizi della tipografia fino ad arrivare al XX secolo.

Nutzungsbedingungen Dieses Digitalisat kann kostenfrei heruntergeladen werden. Die Lizenzierungsart und die Nutzungsbedingungen sind individuell zu jedem Dokument in den Titelnformationen angegeben. Für weitere Informationen siehe auch [Link]

Terms of Use This digital copy can be downloaded free of charge. The type of licensing and the terms of use are indicated in the title information for each document individually. For further information please refer to the terms of use on [Link]

Conditions d'utilisation Ce document numérique peut être téléchargé gratuitement. Son statut juridique et ses conditions d'utilisation sont précisés dans sa notice détaillée. Pour de plus amples informations, voir [Link]

Condizioni di utilizzo Questo documento può essere scaricato gratuitamente. Il tipo di licenza e le condizioni di utilizzo sono indicate nella notizia bibliografica del singolo documento. Per ulteriori informazioni vedi anche [Link]

SEGUNDA PARTE.

PROCEDIMIENTOS PARA EL EXAMEN MICROSCÓPICO Y CONSERVACIÓN DE LOS ANIMALES.

Son muchas las obras que hasta ahora se han publicado sobre técnica microscópica, pues casi no hay laboratorio ni instituto micrográfico que no haya dado á conocer sus procedimientos; pero en todas ellas se nota cierta restricción, puesto que son el reflejo de laboratorios é institutos fisiológicos aplicados á la medicina, y en los cuales se estudia exclusivamente la histología humana, y de los tres ó cuatro animales domésticos que por la mayor facilidad en procurárselos se emplean en las experiencias diarias. Su fin principal es la histología; y se comprende bien que los procedimientos que siguen han de ser muy limitados, puesto que limitado es el número de animales que someten á la experimentación, pertenecientes casi únicamente al grupo de los Vertebrados. En dichas obras, clásicas algunas de ellas, se encontrará un guía seguro para las investigaciones histológicas, mas no para el estudio

morfológico interesante al naturalista, y que en vano trataría de estudiar en los institutos y laboratorios fisiológicos, tal como en el día se hallan montados. A las estaciones zoológicas es preciso recurrir, cuando se trate de los procedimientos que deben seguirse para el examen microscópico, y el tratamiento diverso á que han de someterse los distintos animales; mas como la existencia de estos establecimientos es muy moderna, por más que se trabaje en ellos con constancia, las observaciones y descubrimientos no son aún bastante numerosos para formar un cuerpo de doctrina, reunir muchos procedimientos que dan idénticos resultados, descartar los inútiles, y trazar, en una palabra, la marcha segura que en cada caso se debe seguir. En la actualidad, las revistas y periódicos que se ocupan más ó ménos directamente de microscopia, publican multitud de fórmulas y métodos, y es tal su número, y tan diversas las publicaciones, que el naturalista se pierde en un verdadero caos, si no encuentra un guía seguro que le indique la marcha que debe adoptar. Ese guía difícilmente se hallará en la actualidad en otra parte mejor que en la Estación Zoológica de Nápoles. Por su carácter cosmopolita allí han llevado sus procedimientos especiales los sábios de los más distintos países, lo mismo de Europa que de América; se han examinado y comparado, se ha visto los que eran buenos y los que debían desecharse, y después de larga práctica y experimentación se han adoptado los mejores.

Un tratado completo sobre los métodos de inves-

tigación microscópica seguidos en la Estación de Nápoles no existe. Diseminadas en diversas revistas, sobre todo alemanas é inglesas, se encuentran algunas fórmulas de líquidos conservadores y de coloración; y por primera vez reunió las más importantes el Dr. Mayer, y las publicó en el «Mittheilungen» (II, 1880), y luégo Mr. Whitman en el «American Naturalist» (xvi, 1882). Estos dos trabajos son á cual más interesantes, sobre todo el segundo, que viene á ser una traducción del primero, pero ampliada con varias notas y observaciones comunicadas por el mismo Dr. Mayer y demás Asistentes de la Estación á Mr. Whitman, durante su estancia en Nápoles en el invierno de 1881 á 1882; pero en ambos la cuestión está tratada de un modo tan sucinto y lacónico, que vienen á ser como un formulario anotado ó *memorandum*, de gran utilidad para los que trabajan en la Estación y conocen los procedimientos generales; mas los que no se encuentren en ese caso difícilmente podrán formarse una idea general del método que, tratándose de animales determinados, deben seguir; y dichos trabajos, aunque muy buenos, les serán en muchos puntos incomprensibles, y no sacarán de ellos sino escasa utilidad.

El objeto que me propongo es exponer con claridad los procedimientos generales, y á la vez dar las fórmulas de todos los líquidos, y las observaciones que es preciso tener en cuenta para usarlos; valiéndome para ello de los métodos y fórmulas publicadas en distintas revistas, de los dos artículos

citados, y principalmente de las notas tomadas por mí mismo en la Estación Zoológica, y además, de la poca experiencia que haya podido adquirir trabajando bajo la dirección de su Director y Auxiliares. Por eso, si algo bueno é interesante logro consignar en este trabajo, no me corresponde á mí el mérito; y es un deber mio, antes de pasar adelante, consignar mi gratitud al profesor Dr. Dohrn, Dr. Mayer, Mr. Lo Bianco, Dr. Lang y Dr. Eisig, y también á Mr. Petersen, por haber dirigido mis primeros pasos en la fotomicrografía.

Aunque la base principal de mi trabajo será la exposición de los procedimientos seguidos en la Estación, creo no dejará de tener algún interés que intercale algunas noticias, fórmulas y modos de operar que por propia experiencia conozco son de utilidad, aunque no los haya aprendido en la Estación, ya porque durante mi permanencia en ella no se hubiese presentado ocasión de emplearlos, ya también porque algunos son de tan reciente data que apenas eran entonces conocidos.

Después de exponer los procedimientos consignaré su literatura, que indudablemente tendrá que ser muy incompleta, pues sólo he podido utilizar, para formarla, las notas tomadas en la biblioteca de la Estación, y mis propios libros y revistas científicas, que alcanzan únicamente los tres ó cuatro últimos años; pero así y todo, creo será de alguna utilidad, si no para trazar la historia del procedimiento, por lo ménos para conocerle según le describe su autor. Esta literatura, puesta al final de los capítulos, me

ahorrará intercalar muchas citas; y procuraré que contenga los artículos más notables que hayan llegado á mi noticia, debiendo advertir que, en muchos casos, aunque hago la cita, no es porque yo extracte del sitio indicado, pues he visto operar prácticamente, he operado por mí mismo, ó debo la explicación del procedimiento á sus autores.

Rara vez se podrá hacer la zoología de un animal —según la significación que hoy día se da á esta palabra—sin auxilio del microscopio, y lo mismo puede decirse en Botánica; mas como son pocos los objetos naturales que se prestan á la observación microscópica sin sufrir antes un tratamiento particular, de aquí que para el naturalista sea del mayor interés conocer *ese tratamiento*, que la mayor parte de las veces está ligado con la observación misma. Aun con aquellos animales de dimensiones microscópicas, que se cuentan por millares en una gota de agua, y que viven y se reproducen bajo el microscopio, tales como los Infusorios, se necesita emplear *ciertos procedimientos* para observarlos bien. Si se agitan, y en movimiento vertiginoso atraviesan el campo del microscopio, es preciso pararlos; si los núcleos no son bien visibles, es preciso emplear un reactivo que los ponga en evidencia; si son demasiado transparentes, es preciso colorarlos, y, en todos casos, es necesario conservarlos. Si los animales son de mayor tamaño y no permiten la observación microscópica enteros, se han de reducir á secciones planas, puesto que con el microscopio no se ve más que lo que se encuentra en el pla-

no focal del objetivo conjugado con el del ocular; y estas secciones es preciso colocarlas en circunstancias favorables para la observación. De aquí que, con relación á los procedimientos, pueda establecerse una primera división entre (I) los animales de pequeñas dimensiones—como son los Protozoarios, por ejemplo—que permiten la observación microscópica vivos, y (II) aquellos de mayor tamaño que es preciso reducir á secciones. Esta división, por poco racional que pueda parecer bajo el punto de vista científico, pues un mismo animal puede corresponder á los dos grupos, según que se encuentre en distintos estados de evolución, creo ofrece ventajas prácticas é introduce orden; y por eso en el siguiente capítulo expondré separadamente el método de fijar, colorar y conservar los Protozoarios y demás animales microscópicos, métodos que en realidad no difieren de los generales más que en el modo de operar.

I.

PROCEDIMIENTOS ESPECIALES PARA LOS PROTOZOARIOS.

No son sólo los Protozoarios los que pueden tratarse de la siguiente manera, sino también los *Flagellata*, Noctilucos, Gregarinas, las *Hydra*, Rotíferos, pequeños Crustáceos (*Cyclops*, *Daphnia*), pequeños Nematódos, estados larvarios de algunos Insectos y Crustáceos, formas medusóides de algunos Hidróideos, etc. etc.; y en general todos los

organismos que por su pequeñez reciben el nombre de microscópicos.

Tres son los procedimientos generales que pueden seguirse: *a)* el del ácido ósmico, *b)* el del líquido de Kleinenberg y *c)* el del yodo (1); y para casos particulares muy recientemente se ha propuesto: 1.º el percloruro de hierro, 2.º el ácido crómico, 3.º el tanino y 4.º el óxido de azufre, que examinaré detenidamente, dejando de hablar del ácido piroleñoso y otra porción de sustancias que han caído en desuso, y cuya historia puede verse en el artículo del Dr. Entz citado en la literatura. Mas como los Protozoarios se prestan casi todos ellos á ser examinados vivos con el microscopio, empezaré por los medios de colorarlos en este estado, lo que favorece mucho la observación.

En general, para la preparación de los Protozoarios, hay que hacer las siguientes operaciones:

Matarlos de modo que queden en completo estado de expansión;

Fijarlos y endurecerlos;

Colorarlos, y

Ponerlos en un medio que, á la vez que los conserve, los vuelva transparentes y favorezca la observación, cuidando siempre que en los cambios de

(1) Con el mismo objeto preconiza Mc. Murrich el empleo del sublimado corrosivo. Le usa en disolución concentrada, y el modo de operar es el mismo que con el ácido ósmico. (Am. Nat., xviii, 1884). Véase, más adelante, en los Procedimientos generales, las propiedades de esta sustancia.

líquidos de diferentes densidades sufran lo ménos posible por efecto de la ósmosis.

La explicación detallada de todas estas operaciones se verá más adelante, al hablar de los procedimientos generales, y entonces se comprenderá bien que son cosas diferentes, aunque muchas veces se efectúen sin cambiar de líquido, como sucede, por ejemplo, con las tres primeras, usando el ácido ósmico.

En la Estación se daba la preferencia al yodo y líquido de Kleinenberg por los Doctores Entz y Brandt, que estudiaban los Infusorios y Radiolarios durante mi permanencia en ella.

(*) *Coloración de los Protozoarios vivos.*—Las sustancias más á propósito para colorar los Infusorios, Amebios, Flagelados, Heliozoarios, etc., son:
la Cianina ó Azul de Quinoleina,
el Pardo de Bismarck y
el Violeta de Genciana,

que se fijan, sobre todo, en los gránulos grasientos del protoplasma, pero que no tienen acción alguna sobre los núcleos y nucleolos mientras el animal vive, y aún á veces (Pardo de Bismarck) hasta algunas horas después de muerto. Tampoco tiñen los pelos ni el líquido de la vesícula contráctil. Para obtener este resultado deberá emplearse los dos siguientes colores:

el BBBBB Violeta, y
el Violeta Dahalia;
y á estas dos sustancias hay que añadir, según Brandt, la hematoxilina.

La proporción en que deben usarse para que sólo produzcan efecto tintóreo y no tóxico, es siempre muy pequeña. Mr. Certes encuentra suficiente la solución de cianina á 1 por 50.000, si bien puede aumentarse hasta 1 por 30.000. El Doctor Brandt emplea el pardo de Bismarck en solución de 1 por 3.000, á 1 por 5.000.

Hay que tener bien en cuenta que casi todos los Protozoarios, y especialmente los Infusorios, no pueden vivir en agua destilada, y por lo tanto las soluciones convendrá hacerlas en la misma agua en que viven los animales que se quieren observar. Su resistencia á sufrir la coloración es también muy diferente, pues mientras que los Amebios mueren por lo general á la hora de estar en el líquido colorante, algunos Infusorios no parecen sufrir lo más mínimo por una estancia de un día ó más. El *Paramecium Aurelia* es de los que más resisten y mejor se coloran. En general, después de teñidos puede cambiárseles el agua, y así continúan viviendo perfectamente.

A Mr. Certes se debe un procedimiento bueno y práctico que evita tener que hacer la solución en el agua en que viven los Protozoarios que se quieren colorar. Sobre el *slide* se coloca una gota de solución alcohólica á 1 por 1.000 de uno de los colores antes indicados, y con una varilla de cristal se extiende bien, y se deja secar. Cuando el alcohol se haya evaporado, se pone una gota de agua que contenga los Infusorios sobre el color seco, y enseguida se cubre con el *cover* y se examina al mi-

croscopio. Si la operación se ha hecho bien, y con el suficiente tino para que la gota de agua tome la cantidad suficiente de color para teñir, pero no demasiado grande para que ejerza acción tóxica, se podrán observar perfectamente todos los fenómenos de coloración.

Hasta ahora no son muchas las observaciones que se han hecho sobre este particular, y poco también lo publicado. La indicación de lo que conozco relativo á las notas de Certes, Brandt y Hennequy, lo consigno en la siguiente literatura:

Comptes Rendus, xcii (1881), p. 426; *Zool. Anzeig.*, iv (1881), p. 287; *Biol. Centralblat*, i (1881), p. 287; *Rev. Internat. Sci. Biol.*, viii (1881), p. 71, y *Bull. Soc. Zool. France*, vi (1881).

§ Procedimientos generales.

a.) *Procedimiento del ácido ósmico*.—En histología, desde hace mucho tiempo se usaba el ácido ósmico para colorar los elementos celulares; mas como medio de matar los animales microscópicos, creo ha sido Ranvier el primero que le ha empleado en la *Hydra*; y luégo el Dr. Pelletan, actualmente director del *Journal de Micrographie*, hizo varias experiencias, coronadas del mejor éxito, en los Infusorios y Rotíferos, que ha continuado con brillantez Mr. Certes, en el laboratorio que Mr. Ranvier dirige en el Colegio de Francia. La propiedad principal del ácido ósmico consiste en que mata y fija los Infusorios en la misma forma y posición en que

se encuentran en el momento del contacto; propiedad inapreciable tratándose de animales que están en continuo movimiento, y cambian de figura con tal rapidez, que cuesta muchas veces trabajo, no ya hacerse cargo de los detalles, sino de su forma general. De ordinario la solución que se emplea es del 1 por 100, y en algunos casos raros del 2; y sobre el modo de prepararla hablaré al tratar de este ácido en los Procedimientos generales, así como de las ventajas é inconvenientes de su uso, y medio de remediarlos.

El ácido ósmico puede emplearse de dos maneras: en disolución ó en vapor. Para usarlo en esta última forma se pone una gota del agua que contenga los Infusorios en el *slide* y se extiende bien, cuidando de que sólo quede el agua puramente indispensable. Hecho esto, se invierte sobre la boca de un frasco de boca ancha que contenga la disolución del ácido—al 2 por 100 para que obre con más energía—y de esta manera los animáculos quedan expuestos al vapor, que los mata y fija rápidamente. De ordinario bastará un minuto de exposición.

El contacto directo de la solución—al 1 por 100—sobre los mismos Infusorios produce siempre un efecto más rápido, y convendrá para las especies muy contráctiles. Algunos micrógrafos prefieren hacer llegar el ácido, por capilaridad, entre el *slide* y el *cover*, poniendo una gota de disolución en un costado, y haciendo la aspiración por el opuesto con una tira de papel de filtros; mientras que otros colocan en un cristal de reloj, ó sobre el *slide*, el

líquido con los Infusorios, y con una pipeta vierten sobre ellos una ó dos gotas de ácido, y á la inversa—que da también buen resultado—esto es, colocando sobre el *slide* unas gotas de ácido, y dejando caer en medio de ellas los Infusorios, que una vez muertos van al fondo. Entonces, con una tira de papel de filtros se quita la mayor parte del líquido, y se remplaza por agua destilada; y si se ha operado debajo del *cover*, se hace pasar por entre él y el *slide* una corriente de esta última. Lo principal en esta operación consiste en que el contacto con el ácido se haga *rápidamente*, y en sustraer los organismos á su acción tan pronto como se haya obtenido el efecto fijante.

La acción del ácido ósmico es tan eficaz, que para ponerla en evidencia hace Mr. Certes la experiencia siguiente. Dos tubos se llenan con 30 centímetros cúbicos de agua destilada, y en uno de ellos se introduce una varilla de cristal que se haya mojado antes en agua que contenga Infusorios. Se vierte luego á cada tubo un centímetro cúbico de ácido ósmico—1 por 100—y después de algunas horas el examen microscópico reconoce organismos en el tubo en que se ha introducido la varilla de cristal, mientras que nada revela su presencia en el otro. Esta extrema sensibilidad del ácido ósmico puede aprovecharse para estudiar los organismos animales ó vegetales del agua. Para ello (método Certes) se ponen en un vaso de cristal, de forma apropiada, y de unos 100 centímetros cúbicos de cabida, 30 ó 40 centímetros cúbicos del agua que se quiere exa-

minar, y se vierte en ella un centímetro cúbico de ácido ósmico, á 1,5 por 100. Después de algunos minutos se acaba de llenar el vaso con agua destilada, con objeto de que la solución ósmica quede más diluida y no ejerza perniciosa influencia en los organismos, y se deja reposar para que se sedimenten. Luégo se decanta con mucho cuidado el agua, hasta que sólo quede en el vaso un centímetro cúbico de líquido, y examinado convenientemente en él se encontrarán todas las formas animales y vegetales que contenía el agua objeto del análisis. Para favorecer el examen microscópico será conveniente emplear alguno de los procedimientos de coloración, y lo mismo si se quiere conservar el sedimento (1).

El procedimiento del ácido ósmico puede aplicarse no sólo á los Infusorios, sino á la mayor parte de Protozoarios, larvas de Crustáceos, Anguilulas, *Cyclops*... etc. etc.; mas según Korschelt (véase lit.) no da buen resultado con los Amebios, como luégo se dirá. Yo lo he empleado mucho, y con buen éxito, para fijar las algas unicelulares y zoosporos.

El tiempo que el ácido ósmico debe obrar no puede precisarse, pues depende de la naturaleza de los organismos. La muerte la produce instantáneamente, siempre que la solución esté *bastante concentra-*

(1) Para el análisis micrográfico del agua pueden consultarse las siguientes obras:

Certes, «Analyse micrographique des eaux». Paris, 1883.

Maggi, «Sull'esame microscopico di alcune acque potabile della città di Padova». Pavia, 1883.

Macdonald, «Guide to the Microscopical Examination of Drinking Water»... etc. etc.

da, y el contacto con el animal se efectúe del modo más rápido y brusco posible. Para ello es preciso emplear *abundancia de ácido*, pues si no, al mezclarse con el agua en que están los organismos, se diluye y pierde su eficacia. Después del efecto tóxico produce el endurecimiento, ejerciendo su acción principalmente en el protoplasma y sus gotitas grasientas, que reducen el ácido y fijan el ósmio. De aquí la coloración oscura que toman los Infusorios; y en general puede decirse que cuando ésta aparece debe suprimirse la acción del ácido, por medio del lavado ó de la evaporación.

Los principales inconvenientes del ácido ósmico consisten en que luégo los animales no se coloran bien por los métodos ordinarios, y en que con el tiempo se vuelven negros y opacos. En los Procedimientos generales expondré los medios que se han propuesto para evitar estos dos inconvenientes; pero si los organismos se examinan en estado fresco, encuentro que la ligera coloración oscura que les da el ácido favorece la observación.

Para colorar los animales fijados por el ácido ósmico, lo primero que hay que hacer es lavarlos bien con agua, con objeto de expulsar los últimos residuos de ácido, y luégo tratarlos por las sustancias colorantes, empleando el procedimiento acuoso ó alcohólico según convenga, y según que la preparación definitiva se quiera hacer en glicerina ó en bálsamo del Canadá. Las ventajas é inconvenientes de uno ú otro medio se dirán más adelante; mas si se trata de estudiar bien todas las partes del or-

ganismo, prescindiendo del efecto más ó ménos bonito de la preparación, y de si su duración será mayor ó menor, aconsejaría siempre el uso de la glicerina, y tal vez del fósforo ó del monobromuro de naftalina.

Mr. Certes recomienda para colorar el picro-carminato de amonio, y sobre todo el violeta de Paris. El mejor modo de emplear el picro-carminato es mezclado, en partes iguales, con agua y glicerina. Los colores de anilina conviene también mezclarlos con glicerina, y al tratar de ellos más adelante, se verán sus propiedades y se podrá elegir los más á propósito para obtener el efecto que se desee. El violeta de Paris, tiñe de azul la celulosa; de rojo las sustancias amilóideas, y de azul violeta los *flagellum*, pelos y protoplasma. Conviene siempre que el reactivo colorante ejerza su acción muy lentamente, y luégo se elimina con glicerina diluida, que se sustituye con otra más fuerte, y luégo con glicerina pura; y entonces se cierra la preparación y queda acabada, pudiendo guardarse por mucho tiempo, sin que los organismos presenten señales de alteración.

El Dr. Pelletan es partidario del cloruro de oro para teñir los Infusorios tratados por el ácido ósmico. Su acción es muy inconstante, pero suele dar buenas coloraciones rosa, violeta, azul, verde y púrpura, efecto del oro que se reduce principalmente en los sitios en que el ósmio se ha fijado. El cloruro de oro se emplea en disolución de 1 por 400 ó 500; y el modo de operar consiste en hacer pasar una

corriente por debajo del *cover*. Si las coloraciones obtenidas fuesen demasiado fuertes, pueden aclararse por medio de una disolución débil de ácido fórmico.

Si se quiere preparar con bálsamo del Canadá, después de haber eliminado completamente el ácido ósmico por medio del agua destilada, se pasan los organismos á alcohol de 80 ó 90 por 100—de un modo gradual—y luégo se coloran con una solución alcohólica conveniente. Cuando hayan adquirido el tono deseado, se lavan con alcohol de 70, 80 y 90 por 100, y finalmente con alcohol absoluto. Se pasan después al aceite de clavo, y se montan en bálsamo según los procedimientos ordinarios. Indudablemente el ácido fénico debe tener grandes ventajas sobre la esencia de clavo, pues, hasta ahora, en todos los casos que le he empleado para obtener la deshidratación completa, y servir de intermediario entre el alcohol y el bálsamo, y aún entre el agua y el bálsamo, me ha dado perfectos resultados, sobre todo en preparaciones vegetales.

b.) Procedimiento del líquido de Kleinenberg.—Durante mi estancia en la Estación de Nápoles trabajaba en ella el profesor Entz, tan conocido por sus estudios sobre los Infusorios, y varias veces me afirmó que después de haber empleado casi todos los procedimientos propuestos para fijar los Protozoarios, ninguno encontraba que diese tan buenos resultados como el ácido picro-sulfúrico, ó líquido de Kleinenberg. Casi todas las sustancias propuestas logran el objeto de matar rápidamente y fijar los organismos; mas tratándose de conservarlos, todas

ellas también presentan grandes inconvenientes, de los que parece estar libre el ácido picro-sulfúrico; y tal vez sea esto debido á que no produce efectos perjudiciales aunque esté mucho tiempo en contacto con los animales. Empleando otras sustancias (ácido piroleñoso, ósmico... etc.), sus últimas trazas, que es casi siempre imposible eliminar, por más cuidado que se ponga en el lavado, son la causa de la pérdida de las preparaciones. Además, el ácido picro-sulfúrico tiene la ventaja de admitir perfectamente toda clase de coloración. El modo de prepararle, y sus propiedades generales se podrán ver más adelante, al tratar de los líquidos que sirven para matar y fijar.

El procedimiento que empleaba el Dr. Entz, que sólo es una modificación del que sigue el Dr. Mayer con los animales marinos inferiores, es el siguiente. Los Protozoarios ú otros organismos, con las algas, sedimentos y demás objetos á los cuales están cogidos, ó entre los cuales se mueven, se colocan en un cristal de reloj con una pequeña cantidad de agua, y luégo se vierte encima de ellos algunas gotas de ácido picro-sulfúrico, y se le deja obrar por espacio de uno ó dos minutos. Enseguida se quita todo el líquido y se echa alcohol; ó mejor, con un pincel ó cuchara á propósito se cogen las algas y sedimento, entre los cuales se encuentran los Protozoarios, y se ponen en otro cristal de reloj con alcohol de 60 por 100, con objeto de eliminar el líquido fijador y endurecerlos. A la media hora se cambia el alcohol por otro de 70 por 100, y pueden

guardarse en él los organismos para hacer su estudio detenidamente, ó montarlos en preparación permanente. Si después de algun tiempo el alcohol tomase un color amarillo, producido por el ácido picro-sulfúrico, debe cambiarse; y esto tantas veces cuantas tal coloración se presente.

El Dr. Entz empleaba siempre, lo mismo para hacer las preparaciones definitivas, que para el examen extemporáneo, una mezcla de glicerina y agua; y para la coloración, el carmín, porque según su experiencia, ninguna de las sustancias que generalmente se usan, y sobre todo los colores de anilina, diferencian tan bien los elementos nucleados; y además porque no se decolora con la glicerina. Los organismos pasados del alcohol al carmín adquieren un tono conveniente en 15 ó 20 minutos, á no ser los protegidos por una loriga *chitínosa*, como las Peridineas, *Phacus*, etc., que necesitan algunas horas para poner los núcleos bien de manifiesto.

El Dr. Blanc se sirve también del líquido de Kleinenberg—sin diluir—; pero para los Infusorios y Rizópodos lo modifica añadiéndole el 1 por 100 de ácido acético—dos ó tres gotas por cada 15 centímetros cúbicos—con el objeto de hacer más visibles el núcleo y nucleólos; y prefiere operar con los animales colocados debajo del *cover*, pues dice es tan rápida y completa la impregnación como cuando se hace en el cristal de reloj. Para montar emplea el bálsamo de Canadá; y para colorar la safranina, que pone en relieve el protoplasma ó los

núcleos, á voluntad del operador, preparada según esta fórmula:

Safranina (1).....	5 gr.
Alcohol absoluto.....	15 cm. cúb.

Después de algunos días se filtra, y se mezcla con igual cantidad de agua destilada.

La safranina, como es muy soluble en alcohol, se decolora con los lavados; circunstancia que hay que tener presente, y que se utiliza cuando sólo se quiere teñir los núcleos. Al llegar al tono de color deseado, se sustituye el alcohol por la esencia de clavo, que detiene la decoloración según el Doctor Blanc; pero de las experiencias de Mr. Whitman resulta continuar hasta que se pone en el bálsamo.

c.) Procedimiento del yodo.—El Dr. Brandt, Auxiliar de la Estación—que estaba estudiando los Radiolarios del Golfo—se servía para matarlos de una disolución de yodo al 3 por 100, en alcohol de 70. El método operatorio es enteramente igual al del líquido de Kleinenberg.

La disolución acuosa de yodo, según Kent, tiene idénticas propiedades que el ácido ósmico, sin presentar sus inconvenientes, y puede emplearse en todos los casos de igual manera. Para prepararla se hace una disolución concentrada de yoduro de potasio, disolviendo luego en ella tanto yodo como se pueda; y después de filtrada se diluye con agua

(1) Nó la sustancia colorante del azafran conocida con este nombre, sino la derivada de la toluidina.

destilada, hasta que tome el color amarillo del vino de Jerez.

§§ Procedimientos especiales.

Los procedimientos que acabo de describir se pueden aplicar de un modo general á todos los Protozoarios; mas, como no hay regla sin excepción, con algunos grupos no dan buenos resultados, y pueden observarse mejor empleando un método especial para ellos. Por esta razón indicaré en este párrafo algunos procedimientos, que tal vez puedan ser de aplicación más general el día que, mejor conocidos, se experimenten en otros casos diferentes de los que los han empleado sus autores.

1.) *El percloruro de hierro para matar y fijar los Tintinnóideos.*—El Dr. Fol, en su estudio sobre la familia Tintinnóidea (Infusorios del Orden Peritricha) encuentra que el ácido ósmico no da buenos resultados con estos animales; pues si se emplea en solución débil no fija bien los *cilia* del peristoma, y si fuerte, el cuerpo del animal se pone opaco, y en ambos casos produce una violenta contracción. El líquido de Kleinenberg, lo mismo que los ácidos acético y crómico, no son tampoco más á propósito que el ósmico, á causa de obrar con poca rapidez. Para obviar estos inconvenientes propone el percloruro de hierro—reactivo no usado antes en micrografía—por medio del cual pueden matarse los animales en el más completo estado de expansión. Su uso es parecido al del líquido de Kleinenberg; y

después de bien lavados con alcohol se coloran con ácido pirogálico, que se fija principalmente en los núcleos, tiñéndolos de color pardo oscuro; mientras que las demás partes del animal toman un ligero tinte pardo, que favorece mucho la observación. Los ejemplares que han sufrido este tratamiento se preparan en glicerina ó bálsamo; pero el Dr. Fol es partidario de la primera de estas dos sustancias, porque muestra los detalles con más facilidad.

Es muy probable que el percloruro de hierro no limite su acción á los Tintinnóideos; y sería de utilidad emprender una série de observaciones con ese objeto (1).

2.) *El ácido crómico para matar y fijar los Amebios.*—Ya he indicado que el ácido ósmico no fija bien las diferentes especies de *Amæba*, lo que ha hecho que Korschelt ensayase el crómico, con excelentes resultados. Se emplea en disolución del 2

(1) Después de presentada esta Memoria he visto que el Dr. Fol ha continuado ensayando la acción del percloruro (*Zeitschr. f. Wiss. Zool.*, xxxviii (1883), p. 491 y *Am. Nat.*, xviii, p. 218), y de sus experiencias se deduce que puede emplearse no sólo para matar los Infusorios en general, sino también la mayor parte de animales pielágicos, tales como las Medusas, Ctenoforos, Salpas, Heterópodos... etc. etc.

Por lo regular bastará una solución al 2 por 100; pero si los animales están contenidos en bastante cantidad de agua, pueden emplearse soluciones más fuertes, teniendo en cuenta que si están demasiado concentradas se producen precipitados que es preciso evitar. Cuando los animales, muertos ya, van al fondo, se cambia el líquido por alcohol de 70 por 100 adicionado con unas gotas de ácido clorhídrico con objeto de disolver las sales férricas. Para teñir y diferenciar bien los núcleos conviene perfectamente un tratamiento, durante 24 horas, por una solución de ácido gálico al 1 por 100.

por 100, de igual manera que el líquido Kleinenberg. Los Amebios quedan de esta manera en la misma posición y forma en que se encontraban en el acto de obrar el reactivo; y tanto las vacuólas como los núcleos aparecen perfectamente diferenciados.

3.) *El ácido tánico para fijar algunos Infusorios y hacer muy visibles los cilia.*—La acción del ácido tánico sobre algunos Infusorios, y particularmente sobre el *Paramæcium Aurelia* (del Orden Olotricha), se observa fácilmente de la siguiente manera. Sobre el *slide* se coloca una gota de agua que contenga los *Paramæcium*, y á su lado otra de ácido tánico disuelto en glicerina—ácido tánico 1, glicerina 4—y se hace de modo que las dos gotas se mezclen lentamente. En el acto se nota que los *Paramæcium* quedan inmóviles y que los *cilia* ó pelos que cubren su cuerpo se ponen rígidos y estirados, siendo muy visibles, mientras que sin el auxilio del tanino difícilmente se aperciben. El animal continúa por eso vivo, pues se observa el movimiento de las vesículas contráctiles, como si el ácido hubiese sólo obrado en los pelos y parte exterior. Su acción debe ser parecida á la curtiente que ejerce en las sustancias gelatinosas, y por tanto debe poner opacos los pelos que tan transparentes son en el estado vivo del Infusorio.

El descubrimiento de esta propiedad del tanino es debido á Waddington, que la dió á conocer á la Real Sociedad de microscopia de Londres, en Marzo de 1883; pero hasta la fecha no sé que se hayan

publicado más investigaciones sobre el particular (1), y es de presumir que su acción no se limitará al *Paramœcium Aurelia*; y si fuere así, sería un poderoso auxiliar para el estudio de los apéndices tegumentarios de los Infusorios, difíciles de observar á causa de su finura, transparencia y rápida motilidad. Para que los pelos queden bien extendidos, y como filamentos rectos, es conveniente que la mezcla del tanino no sea demasiado fuerte, pues en ese caso los inmoviliza de repente y quedan enredados en las extremidades; ni demasiado floja, porque entonces se entrecruzan y encorvan, como si el animal se hubiese movido á medio fijar. La mezcla del ácido con la glicerina se presta bien á regular su acción de un modo conveniente.

4.) *El óxido de azufre para inmovilizar los Infusorios y examinar sus apéndices tegumentarios.*— Este procedimiento es debido también á Waddington, lo mismo que el anterior. El óxido de azufre es mucho más soluble en alcohol que en agua, y, por tanto, cuando una solución concentrada en el primero de estos dos líquidos se mezcla con el segundo, como la capacidad de saturación disminuye, el óxido de azufre se desprende en estado libre. Esta propiedad se aprovecha para hacer obrar el óxido

(1) Estando para imprimirse estas líneas he visto que las experiencias de Mr. Waddington han sido repetidas por el profesor Kellicott y por Mr. Gilliatt, descubriendo en el *P. Aurelia* la existencia de *trichocistos* en lugar de simples pelos. Pueden verse las observaciones del primero en el *Bull. Buffalo. Nat. Field clup*, 1 (1883) y las del segundo en los *Proc. Linn. Soc. N. S. Wales*, VIII (1883).

sobre los Infusorios, de la siguiente manera. A una gota de agua en que éstos estén sobre el *slide*, se mezcla una pequeña cantidad de disolución concentrada en el alcohol, y enseguida el gas se desprende; y si las cantidades han sido bien reguladas para que ejerza su acción, pero para que no mate, los Infusorios quedarán inmóviles, y se podrán observar perfectamente todos los apéndices tegumentarios.

La solución alcohólica tiene además la ventaja de ser estable, al contrario de lo que sucede con la acuosa, que en contacto del aire sufre una superoxidación, y se transforma en ácido sulfúrico.

Los trabajos más importantes que en estos últimos años se han publicado respecto á los procedimientos para el examen microscópico de los Protozoarios, y que han llegado á mi noticia, son los siguientes:

Dr. Pelletan, *Jour. Micrograph.* (1878), número Abril; *Anal. Soc. Belge de Microscopie*, iv.—Monsieur Certes, *Comptes Rendus*, LXXXVIII (1879), p. 433; id. id., p. 1.039; id. id. xc (1880), p. 1.435; *Jour. Micrograph.* (1879), p. 242; *Bull. Soc. Zool. France*, vi (1881), p. 36.—Mr. Jeffery Parker, *Jour. Royal. Microscop. Society*, III (1879), p. 381.—Dr. E. Korschelt, *Zool. Anzeig.*, v (1882), p. 217; id. id., v (1882), p. 336.—Dr. Landsberg, *Zool. Anzeig.*, v (1882), p. 336.—Dr. Redding, *Proc. Amer. Soc. Micr.*, 5.º meeting (1882), p. 183.—Dr. Entz, *Zool. Anzeig.*, iv (1881), p. 575.—

Dr. Blanc, *Zool. Anzeig.*, VI (1883), p. 22.—Kent, *Manual of the Infusoria*, 1880-1, p. 114.—Waddington, *Jour. Roy. Microscop. Society*, Abril de 1883, p. 185.—Dr. Fol, *Arch. Sci. Phys. et Nat.*, IX (1883), p. 534; *Am. Mag. Nat. Hist.*, XII (1883), p. 13; *Zèitschr. f. Wiss. Zool.*, XXXVIII (1883), p. 491, y *Am. Nat.*, XVIII, p. 218.

II.

PROCEDIMIENTOS PARA LOS ANIMALES MARINOS EN GENERAL.

La exposición general de las operaciones que hay que efectuar con un animal, desde el momento de su captura, hasta que dispuesto en séries se presta á la observación micrográfica, es la siguiente:

1.º Matarle de modo que conserve su estado de expansión si es contráctil, y en todos casos su forma natural.

2.º Fijar sus tejidos, y endurecerlos.

3.º Ponerle en un líquido y en condiciones convenientes para que pueda conservarse por un espacio de tiempo indefinido.

4.º Si el ejemplar entero no ha de ser objeto de observación, disecarle y separar de él la parte conveniente para el estudio.

5.º Ya porque sea demasiado transparente, ó porque se desee diferenciar bien los tejidos, teñirle *in toto* con colores á propósito.

6.º Endurecerle para que se pueda seccionar de un modo conveniente. (Inclusión é Imbibición).

7.º Reducirle á secciones.

8.º Colorar las secciones, si no se ha teñido el ejemplar *in toto*.

9.º Montar las secciones.

Estas nueve operaciones se pueden reunir en cuatro grupos:

A.—Matar, fijar y conservar el ejemplar;

B.—Disecarle;

C.—Teñirle, y

D.—Seccionarle;

y en este orden describiré los procedimientos para efectuar del modo más conveniente cada una de ellas.

A.—PROCEDIMIENTOS PARA MATAR, FIJAR Y CONSERVAR.

Este grupo de operaciones, esencialmente diferentes aunque algunas veces se confunden por efectuarse con un sólo líquido, es indudablemente el que ofrece mayores dificultades, porque no pueden darse para él reglas precisas y concretas. El procedimiento antiguo, y comunmente seguido, consiste en introducir el ejemplar, sin preparación alguna, en alcohol ú otro líquido compuesto de sustancias antisépticas; y de esta manera es completamente imposible conservar la mayor parte de animales, excepto los Vertebrados en estado adulto, y muy pocos Invertebrados. Supongamos, por ejemplo, que acabamos de coger una de esas magníficas Anémonas de mar, y que de repente la introducimos en un frasco lleno de alcohol. Al pronto, extenderá sus tentáculos,

y abrirá su radiante corola; mas enseguida, y en las ansias de la muerte, replegándose sobre sí misma y contrayéndose, aquel animal gracioso que ha merecido compararse á una flor, se convertirá en una masa informe de materia gelatinosa, que ni remotamente nos recuerda la preciosa Anémona que un momento antes contemplábamos. Mucho pudiera repetir estos ejemplos, mas con el expuesto basta para mi objeto. Supongamos ahora, para fijar las ideas, que se trata de la *Actinia equina*, y que después de pescada la ponemos en un vaso con agua corriente. A las pocas horas, ó á veces después de un día ó más, veremos que poco á poco se anima, y con cierto recato saca primero un tentáculo, luego otro, y por último despliega su corona, que bajo la apariencia de una inocente flor, tan temible es para los pequeños animales que se acercan á ella. De esta manera, inmóvil, estará horas y horas; mas al menor indicio de peligro—una sacudida brusca del vaso, un cuerpo extraño que la toque—con prontitud se encoge y cierra dentro de su cuerpo toda la corona de tentáculos. Si la queremos conservar en estado de expansión, es preciso buscar un medio rápido de matarla, sin darla tiempo á que se contraiga. Para ello, dejémosla en el mismo vaso con la menor cantidad de agua posible, y aguardemos un momento en que esté bien extendida. Entonces, si con rapidez vertemos sobre ella una cantidad de ácido acético bastante grande, su muerte se producirá instantánea, sin darle tiempo para contraerse y guardar los tentáculos. Su posición y su forma

será la misma que tenía cuando viva, en estado de expansión. Con esto queda dado el primer paso, y vencida la primera dificultad: tenemos la *Actinia* muerta en su forma natural, y por lo tanto nada debemos temer ya de su excesiva contractilidad; pero la operación no ha terminado aún, pues al poco tiempo veríamos que el animal empieza á ablandarse y ponerse transparente, y al fin se convertiría en una masa gelatinosa y sin forma. Es, pues, preciso, después de muerta la *Actinia* en buenas condiciones, impedir que entre en maceración. Para ello, y teniendo en cuenta que el ácido acético obra enérgicamente hinchando los tejidos, es preciso quitarle enseguida, y cambiarle por otro líquido que tenga propiedades fijadoras, es decir, que combinándose más ó ménos con las sustancias de las celdillas, forme compuestos estables, y al mismo tiempo que dé á las paredes, ó á su contenido, consistencia bastante para que el animal, endureciéndose, conserve la forma, resistiendo á su propio peso. Esto se obtendrá por medio de una disolución de ácido crómico, y de esta manera tendremos la *Actinia* en su forma natural de expansión, con sus elementos histológicos fijados, y bastante endurecida para que resista á su propio peso. Mas en el ácido crómico no puede permanecer mucho tiempo sin alterarse, y por lo tanto es preciso trasladarla á otro líquido que no tenga sobre ella efectos nocivos, y en el cual pueda conservarse por tiempo indefinido. Este líquido será el alcohol. Se vé, pues, en este ejemplo, que son tres distintas las operaciones que hemos tenido

que hacer: matar con el ácido acético, fijar y endurecer con el ácido crómico, y conservar con el alcohol.

Si en lugar de la especie que nos acaba de servir de ejemplo hubiésemos elegido otra Actinia, la *Calliactis effoeta*, el ácido acético no hubiera dado tan buen resultado, y para matarla en buenas condiciones deberíamos recurrir al humo de tabaco, empleado según el procedimiento de Mr. Lo Bianco, que en su lugar describiré. En este caso también, las tres operaciones de matar, fijar y endurecer, y conservar, hubieran sido distintas y efectuadas con diferentes sustancias; mas no siempre sucede así, pues muchas veces—cosa que debe procurarse siempre que se pueda—el mismo líquido que sirve para matar endurece á la vez; y otras se emplean mezclados los agentes de matar y endurecer—ácido acético y crómico, ó acético y ósmico, por ejemplo—pero aún en estos casos las tres operaciones se manifiestan perfectamente distintas. El procedimiento general para la mayor parte de especies del género *Salpa*, por ejemplo, consiste en tratarlas por una mezcla de ácido crómico y ósmico, y luego pasarlas al alcohol. El primero de estos dos líquidos mata el ejemplar en el acto; mas si se pone enseguida en alcohol, se arruga y deforma, entrando al poco tiempo en maceración. Es preciso, pues, no sólo matar, sino también fijar los elementos y endurecer, y eso se obtiene dejándole una hora ó más, según el tamaño, en la mezcla crómico-ósmica. Aquí se vé que el ácido crómico-ósmico en el primer mo-

mento mata, y luégo, con auxilio del tiempo, fija y endurece; y tanto son dos operaciones distintas, que puede hacerse bien una y mal la otra, como este ejemplo acaba de demostrar. En todos casos se pueden pues distinguir perfectamente las tres operaciones de *matar*, *fijar y endurecer*, y *conservar*; é insisto en eso, porque creo que introduce mucho orden, y quita algo el empirismo con que hasta ahora se ha tratado esta cuestión; pues se puede ver, si un procedimiento da malos resultados, en dónde está su parte débil, y modificarle para que cumpla con las condiciones que debe llenar para cada una de las tres operaciones.

A pesar de la gran importancia que tienen los procedimientos de matar y conservar en las ulteriores operaciones del examen microscópico, casi nada se ha escrito sobre ellas. Bien es verdad que constituyen una especialidad de la Estación Zoológica, y que los animales marinos inferiores (Celenterados, Gusanos, Tunicados) á penas se han visto regularmente representados en los museos más célebres de Europa, antes que figurasen en ellos las colecciones salidas de la Estación; y que los métodos que se siguen para prepararlos, son muy poco conocidos. Como prueba de ello citaré el siguiente párrafo del acreditado periódico norte-americano «*American monthly microscopical journal*» — Diciembre de 1883—escrito por su director Mr. Hitchcock desde Londres, al dar cuenta de la colección de animales marinos presentada por el Dr. Dohrn en la Exposición de pesquería: «El método seguido en Nápoles

para matar los animales marinos es, en resumen, según nos hemos informado, el siguiente: Los ejemplares vivos se introducen en una solución de yodo ó de sublimado. De una ú otra de estas dos soluciones, que según parece matan rápidamente á los animales y endurecen sus partes blandas, se pasa á alcohol diluido, en el que se conservan de un modo permanente.» Ya se verá cómo la cosa no es tan sencilla como Mr. Hitchcock pretende; y á continuación trataré de agrupar los diversos animales que tienen un tratamiento parecido, y de dar las pocas reglas generales que he podido deducir de los numerosos casos particulares que tuve ocasión de ver, y al mismo tiempo las fórmulas de los líquidos empleados, y la marcha que se debe seguir con cada uno de ellos.

La primera dificultad con que se tropieza consiste en la gran diversidad en el modo de ser de los animales marinos, pues mientras una especie va bien tratándola de una manera, otra que le es muy vecina, y á veces del mismo género, no da resultado.

A pesar de eso, de un modo general, pueden dividirse en estos cuatro grupos:

- 1.º Protozoarios.
- 2.º Animales contráctiles ó retráctiles.
- 3.º Animales blandos no retráctiles.
- 4.º Animales duros no retráctiles.

Los Protozoarios comprenden ejemplares de todos los grupos. Retráctiles en alto grado como las *Vorticella*, duros, con coraza ó loriga *chitinoso*, blandos, contráctiles, etc. etc.; pero de ellos prescindiré

ahora, porque ya he expuesto los métodos generales que se pueden seguir para matarlos, fijarlos, colorarlos, y prepararlos para la observación microscópica. La segunda división, ó sea la que comprende los animales contráctiles ó retráctiles, en todo ó en parte, es muy numerosa y merece particular atención, pues del conocimiento de su mayor ó menor contractilidad depende la elección de un buen método para matarlos. Aunque sea de un modo muy incompleto, señalaré algunos grupos de animales pertenecientes á esta clase y á la siguiente.

Retráctiles ó contráctiles son, en mayor ó menor grado:

Todos los Alcionarios: *Alcyonium*, *Pennatula*, etcétera etc.

Los Zoantarios: *Actinia*, Madreporas, etc.

Las formas políperas ó hidróideas de los Hidróideos.

Los Cirrípodos.

Los Rotíferos.

Los Moluscos bivalvos. (Lamelibránquios).

Los Gastrópodos.

Las Estrellas y Erizos de mar (*Asteroidea* y *Echinoidea*), por los ambulacros.

Las Holoturias, por los tentáculos y tubos ambulacros.

Los Nemertinos y Gephyrianos, por su trompa retráctil.

Las Planarias.

La mayor parte de Anélidos tubícolas, por sus bránquias libres, etc. etc.

A los animales blandos, no retráctiles—casi todos pielágicos—pertenecen:

Las formas medusóideas de los Hidróideos.

Las Traquimedusas.

Los Sifonoforos.

Los Acalefos.

Los Ctenoforos.

Algunos Anélidos pielágicos.

Algunos Crustáceos Copepodos (pielágicos).

Los Pterópodos.

Los Heterópodos.

Los Tunicados, etc. etc.

Los animales pertenecientes á estos dos grupos son los que ofrecen mayores dificultades. En los primeros consiste ésta en matarlos en estado de expansión natural, y en los segundos en darles la dureza suficiente para que no pierdan la forma y entren en maceración.

Las siguientes sustancias, en distintas combinaciones y empleadas de distintas maneras, son las que se usan para matar, fijar y endurecer los animales.

Alcohol,

Alcohol ácido,

Alcohol yodado,

Acido picro-sulfúrico, ó líquido de Kleinenberg,

Acido picro-nítrico y picro-clorhídrico,

Acido crómico,

Acido cromo-nítrico,

Acido ósmico,

Acido cromo-ósmico,

Bicloruro de mercurio,

Líquido de Merkel,

Acido acético,

Agua dulce,

Humo de tabaco y
Acido carbónico.

Las cuatro últimas no tienen ninguna acción fijante ni endurecedora, y el ácido acético hincha además los tejidos, de modo que sólo debe usarse en aquellos casos en que más se atiende á la parte morfológica que á la histológica del ejemplar. De todas ellas es la que mata más rápidamente, siguiéndole luego el sublimado caliente. Las demás endurecen y fijan los elementos histológicos; pero como su acción sobre ellos es diferente, de aquí que se empleen muchas veces mezcladas para utilizar las propiedades de varias á la vez. Cuando sólo se trata de endurecer se usa de ordinario el ácido ósmico, ó crómico, ó la mezcla de los dos, y en combinación también con el alcohol.

A continuación se enumeran las propiedades de estas diferentes sustancias, y el modo de usarlas.

1. *Alcohol*.—Sirve para matar, conservar, y para endurecer. Para conservar es el único líquido que se emplea en la Estación; y según la larga experiencia que en esta materia tiene Mr. Salvatore Lo Bianco, aventaja á todos los líquidos que han sido propuestos hasta ahora; y si empleándolo del modo ordinario, es decir, introduciendo el ejemplar en él sin previa preparación, da casi siempre malos resultados, no sucede así usándolo de un modo conveniente. Como líquido conservador el alcohol ha de ser de 70 por 100.

Las principales propiedades del alcohol consisten en su rápida acción sobre las sustancias protoplás-

micas, que coagula, y en su poder deshidratante, que endurece. Para matar puede emplearse de tres maneras: *a)* rápida ó *b)* lentamente, y *c)* hirviendo.

a.) Método ordinario.—Para usarle en la primera forma basta introducir el ejemplar en un frasco de alcohol; pero este método sólo puede seguirse con animales duros ó de bastante consistencia, y que al mismo tiempo no sean contráctiles ni retráctiles en todo ni en parte (Vertebrados, pequeños Cefalópodos, algunos Crustáceos, etc.). El Dr. Mayer señala para el alcohol empleado de esta manera, los siguientes inconvenientes:

1.º En los animales provistos de cubiertas *chitinosas*, el alcohol no penetra hasta el interior del cuerpo, y las partes centrales entran en maceración, y se descomponen.

2.º Con los pequeños Crustáceos (*Amphipoda* é *Isopoda*) da lugar á un precipitado que suelda las diferentes partes del cuerpo, y es luego sumamente difícil separarlas sin que se rompan.

3.º Precipita la mayor parte de las sales contenidas en el agua de mar, y forma una costra en la superficie del animal, que impide que el mismo alcohol llegue bien al interior.

4.º Esta costra no permite que penetren las soluciones alcohólicas de los diversos colores, al tratar de teñir *in toto* el animal.

Estos inconvenientes se remedian usando el alcohol ácido, como luégo diré; y ninguno de ellos se presenta cuando al animal, después de muerto por alguno de los procedimientos adecuados, tales como

el ácido picro-sulfúrico, ósmico... etc., se conserva en este líquido. Los grandes Cefalópodos, por ejemplo, si se matan rápidamente con alcohol, no se conservan por mucho tiempo, porque en los brazos y demás partes gruesas no puede penetrar hasta el centro, por las causas arriba indicadas. Para evitar eso se introducen antes en una disolución de ácido crómico, y de esta manera el alcohol los penetra perfectamente, y no sobreviene ni la maceración, ni la putrefacción.

Debe tenerse en cuenta que el alcohol, aún después de que el ejemplar ha sufrido la acción de los líquidos á propósito para matar, endurecer y fijar los elementos histológicos, produce siempre una gran contracción en las partes blandas, y por tanto *nunca* se pasará de una solución acuosa á alcohol de 70 por 100, de un modo brusco. Es preciso ir por grados y sucesivamente, poniendo mayor ó menor cuidado según las condiciones del ejemplar. De ordinario, en la Estación, se suelen pasar los animales delicados, de un líquido acuoso—el de Kleinenberg, por ejemplo—á alcohol de 50 por 100, y después de algunas horas á alcohol de 60 por 100, y luégo de 70 por 100. Esta regla es preciso tenerla siempre muy presente, sobre todo tratándose de animales blandos y delicados, como son las Medusas, Pterópodos, Heterópodos, etc.; pues por bien que se hayan hecho las operaciones de matar y fijar, los ejemplares se arrugan y contraen hasta el punto de perder su forma, si se introducen de repente en alcohol demasiado fuerte. La misma marcha deberá

seguirse cuando, con objeto de deshidratar ó endurecer, se pasa del alcohol de 70 al absoluto.

El mejor alcohol para conservar es el de 70 por 100, pero hay que tener cuidado de que realmente sea de este título. Si se ha operado bien, conserva perfectamente los ejemplares, sin dar lugar á sedimentos ni coloración alguna, como puede verse en las magníficas preparaciones de la Estación de Nápoles, en que el líquido claro y transparente en que están conservadas, no es más que alcohol de 70, sin adición de otra sustancia alguna. Para ello es preciso que el ejemplar se encuentre en condiciones de ser completamente permeable, por medio de los procedimientos de matar y endurecer que anteriormente ha recibido; y en los casos en que el alcohol sirve para matar, debe usarse en abundancia, y cambiarse muchas veces, pues hay que tener en cuenta que los líquidos acuosos que contiene el cuerpo del animal hacen bajar su título. Así mismo deberá cambiarse todas las veces necesarias para que quede limpio y sin color alguno.

Además, se usa el alcohol para endurecer y deshidratar, como se verá más adelante. Los ejemplares tratados por el ácido pícro-sulfúrico, que por sí no endurece, toman mucha consistencia en el alcohol y se coloran luégo perfectamente, lo que sucede también á los que no han recibido más tratamiento que el de este líquido, debido á que no forma compuestos insolubles con las sustancias celulares, como sucede con los ácidos crómico y ósmico, por ejemplo.

b.) Alcohol lentamente.—Para matar muchos

animales blandos y contráctiles, tales como los Nermertinos, Anélidos (excepto los que tienen las bránquias retráctiles, y los pielágicos), Briozoarios, Lamelibránquios y Gastrópodos (excepto los Opistobránquios), da muy buenos resultados el siguiente procedimiento. Se coloca el ejemplar en un recipiente de cristal, de forma apropiada, lleno de agua de mar, y con una pipeta se dejan caer unas cuantas gotas de alcohol en la superficie. Como es más ligero que el agua, sobrenada; pero por efecto de la difusión se van mezclando lentamente los dos líquidos. El animal, al experimentar la débil acción del alcohol, se extiende en su forma natural: los bivalvos abren la concha y alargan los sifones y pié, los Gastrópodos sacan la cabeza... etc., etc. Al cabo de un rato se vuelven á echar unas cuantas gotas de alcohol, luégo otras cuantas, y así sucesivamente hasta que el animal ha perdido completamente la sensibilidad. De esta manera los Anélidos quedan blandos y se pueden poner en la forma que se quiera, clavándolos con alfileres á un recipiente con fondo de corcho; y luégo se endurecen pasándolos á alcoholes de distintos grados, hasta terminar con uno de 70 por 100, ó bien por medio de alguno de los líquidos endurecedores. Este método es el que emplea el Dr. Eisig para matar los Anélidos marinos, obteniendo los resultados más satisfactorios. Con los bivalvos lo he visto emplear á Mr. Lo Bianco con igual éxito. Los animales entran antes de morir en un estado de sopor, que no les permite contraerse, sino que, por el contrario, extienden las

bránquias, tentáculos, sifones, etc. etc. Tiene este método el inconveniente de ser algo largo, pues á veces tarda el animal en morir muchas horas, y hay que tener el cuidado de ir añadiendo poco á poco, y de cuando en cuando, alcohol, procurando no mover el líquido para que la difusión se haga lentamente; pero presenta la ventaja de que los ejemplares quedan muy bien, evitando los efectos de contracción y distorsión que casi siempre produce el alcohol. Además, el inconveniente que antes he señalado de la formación de una costra impermeable en la superficie del ejemplar, efecto de la precipitación de las sales marinas, no se produce de esta manera, y las tinturas alcohólicas, como el carmín borácico, penetran bien y se puede colorar *in toto* perfectamente.

Cuando se desee que la difusión del alcohol se haga muy lentamente, puede emplearse el procedimiento de Mr. Lo Bianco, que consiste en verter á la superficie del agua, no alcohol sólo, sino una mixtura compuesta de:

Alcohol (70 por 100).....	40
Glicerina ($C_3H_8O_3$).....	20
Agua de mar.....	40

Como es más ligera que el agua, sobrenada, y se va mezclando lentamente; pero según el mismo Mr. Lo Bianco me ha manifestado, los resultados que se obtienen vienen á ser, en muchos casos, los mismos que por el método anterior. El Dr. Andrés, Auxiliar de la Estación cuando yo estuve, y hoy Profesor de la Universidad de Milán, se servía de

esta mezcla para matar las *Actinias*, y creo haya sido el primero en darla á conocer en su trabajo «Intorno all'Edwardsia Claparedii».

Algunas veces conviene emplear otro procedimiento para matar lentamente, que consiste en introducir el ejemplar en una mezcla de agua y alcohol, é ir añadiendo alcohol hasta producir los efectos convenientes. Mr. Lo Bianco sigue este método para matar varias especies de *Lumbriconereis*.

c.) *Alcohol hirviendo*.—En contraposición al método lento, el Dr. Mayer emplea con algunos Artrópodos, que se resisten á todos los medios, el alcohol absoluto hirviendo. Según sus experiencias es el único medio de conservar el tejido dérmico de los *Tracheata*, pues el alcohol frío los penetra muy despacio.

2. *Alcohol ácido*.—Los inconvenientes que ofrece el empleo del alcohol del modo ordinario, debidos á su falta de poder penetrante, y á la propiedad de precipitar las sales marinas, según queda anteriormente indicado, los evita el Dr. Mayer con el alcohol ácido.

Alcohol (de 70 á 90 por 100).....	95 vol.
Acido clorhídrico (HCl.).....	3 vol.

Hay que tener cuidado, antes de usarlo, de mover bien el frasco; y ha de estar recientemente preparado, pues con el tiempo se forman compuestos de éter, y pierde las propiedades ácidas. Da muy buenos resultados para matar ejemplares grandes, sobre todo si se destinan á colecciones y museos, pues siendo penetrados perfectamente por el alcohol,

se conservan bien. Para los pequeños, y sobre todo si se destinan á estudios histológicos, es preferible el ácido picro-sulfúrico; pero de todos modos, se obtienen siempre mejores resultados que con el alcohol puro. El ejemplar debe introducirse de repente en el líquido ácido, y dejarle sólo en él el tiempo necesario para que quede bien penetrado, lo que depende de su naturaleza y tamaño; y enseguida debe pasarse á alcohol de 70 ó 90 por 100, y cambiarlo de tiempo en tiempo hasta que no queden trazas de ácido. Este método puede emplearse en los mismos casos que el alcohol rápidamente, pero debe tenerse presente sus propiedades decalcificantes.

3. *Alcohol yodado*.—Mr. Lo Bianco emplea el alcohol yodado para matar los Anélidos pielágicos, tales como los *Alciopa*, *Alciopina* y *Vanadis*; y según el Dr. Brandt es el medio mejor para tratar los Radiolarios, como ya he dicho en su lugar.

Mr. Lo Bianco emplea la siguiente fórmula:

Alcohol de 70 por 100.....	100
Yodo.....	3

Enseguida que el yodo ha producido su efecto—bastan generalmente uno ó dos minutos—se pasa el ejemplar á alcohol de 70, y se cambia repetidas veces hasta que no presente la coloración amarilla que le da el yodo.

Aunque no se refiera á animales, indicaré el procedimiento para conservar las Algas marinas, debido á Mr. Berthold—que ha publicado una Sinópsis de las existentes en el Golfo de Nápoles—y que tuve ocasión de emplear repetidas veces en la Esta-

ción. No conserva el color, pero fija perfectamente las celdillas. Las Algas se introducen de repente en un vaso de agua de mar, á la que se haya mezclado una pequeña cantidad de tintura de yodo. El agua debe tener el color del vino de Jerez. Se las deja un minuto, y se pasan enseguida á alcohol de 50 por 100, que se cambia repetidas veces.

Recientemente el Dr. Berthold ha hecho nuevas experiencias sobre el mejor modo de conservar las Algas marinas, y ha encontrado que el ácido ósmico y el sublimado dan también buenos resultados, si bien inferiores á los del yodo; pero con la precisa condición de que todas las soluciones han de hacerse con agua de mar, pues con el agua dulce se produce una violenta osmosis que contrae las sustancias protoplásmicas.

4. *Acido picro-sulfúrico, ó Líquido de Kleinenberg.*—En un trabajo sobre la *Lumbricus trapezoides* (véase lit.) propuso por primera vez el Dr. Kleinenberg, el ácido picro-sulfúrico como sustituto del ácido ósmico para matar y fijar; y luégo el Dr. Pablo Mayer (Asist. de la Est. Zool.) ha extendido su uso, después de haberlo experimentado por largo tiempo, en vista de los buenos resultados que con él se obtienen. La fórmula del Dr. Kleinenberg es la siguiente:

Acido picrico ($C_6H_2(NO_2)_3OH$). (Sol. conctr.). 100 vol.
Acido sulfúrico concentrado. (H_2SO_4)..... 2 vol.

Después de separar el precipitado de ácido picrico que se forma al mezclar los dos líquidos, se añaden unas cuantas gotas de creosota, y se agita bien.

Esta solución suele emplearse diluida en tres volúmenes de agua.

El Dr. Mayer ha modificado algo la fórmula anterior, y en la Estación se prepara de la siguiente manera:

Agua destilada.....	100 vol.
Acido sulfúrico concentrado.....	2 vol.
Acido pírico (todo el que se pueda disolver.)	

Filtrese y dilúyase, como anteriormente, en tres volúmenes de agua.

El objeto del Dr. Kleinenberg al poner la creosota es que no se hinche el tejido conectivo; mas, según el Dr. Mayer, esto no se evita, y por esa razón la suprime en su fórmula. Lo que debe hacerse es tener en cuenta su acción, sobre todo cuando se emplea con los vertebrados.

El ácido picro-sulfúrico sirve para matar y fijar los elementos celulares, pero no endurece. Penetra rápidamente los tejidos, tomando el lugar del agua (Dr. Mayer), y luego puede ser *completamente* reemplazado por el alcohol; y como—á diferencia del ácido crómico y ósmico—no forma compuestos insolubles con las sustancias celulares, permite que obren perfectamente los líquidos colorantes, lo mismo acuosos que alcohólicos. Ninguna de las sustancias que hoy se emplean para matar es de un uso tan general. Actúa de un modo rápido con los animales pequeños, sobre todo con los blandos y contráctiles. El Dr. Entz, como ya he dicho en su lugar, le tiene por el mejor líquido para matar los Infusorios. Con los animales muy contráctiles, tales como, por ejem-

plo, los Alcionarios, Zoantarios, Hidróideos, etcétera, no da tan buenos resultados, porque el animal se encoge antes de morir; y con los que están protegidos por una cubierta *chitínosa*, es preciso hacer una abertura, é introducir el líquido por medio de una pipeta.

Este reactivo debe dejarse obrar hasta que haya penetrado bien al objeto, lo que de ordinario sucede á las tres ó cuatro horas, ó más si es de gran tamaño, y hay que emplearlo en abundancia, cambiándolo, si se enturbia, tantas veces como sea preciso para que permanezca claro. A diferencia de lo que sucede con el ácido ósmico y crómico, se puede dejar el ejemplar en el líquido, por mucho más tiempo del necesario, sin inconveniente alguno. Yo he guardado de esta manera, durante algunos meses, huevos y embriones de trucha, sin que los tejidos más delicados sufriesen lo más mínimo. El líquido de la vesícula vitelina no se había coagulado, y se conservaba transparente, distinguiéndose perfectamente todo el sistema vascular. En resumen: siempre que se quiera estudiar la parte histológica, se encontrará ventaja en el uso del ácido picro-sulfúrico.

El animal, una vez bien penetrado por el ácido, será trasladado á alcohol de distinto grado, según se tema más ó ménos el encogimiento y distorsión de sus tejidos. Los objetos muy delicados se cogerán con una pipeta ó espátula, de manera que lleven con ellos una *atmósfera* de líquido, y se introducirán con cuidado dentro de un vaso con alcohol de 50

por 100. De esta manera la difusión se hace paulatinamente, y se evita el choque fuerte, y la violenta ósmosis producida al penetrar el alcohol en los tejidos de un modo brusco. Al poco rato la difusión habrá tenido lugar, y entonces se cambiará el alcohol, aumentando su grado, y teniendo cuidado de mudarle tantas veces como sea necesario para que no presente coloración alguna.

*) *Acidos picro-nítrico y picro-clorhídrico.*—El ácido picro-sulfúrico presenta un inconveniente con los animales que tienen partes calcáreas (Moluscos, Crustáceos, Equinodermos, etc.), pues impregna los tejidos de sulfato de calcio, que es insoluble. Para evitar esto, el Dr. Mayer usa el ácido picro-nítrico ó picro-clorhídrico, compuesto de esta manera:

Agua.....	95 vol.
Acido nítrico (25 por 100, HNO_3) ó	} 5 vol.
Acido clorhídrico (25 por 100, HCl)	
Acido pírico (todo el que se pueda disolver.)	

Así se evita la formación de cristales, pues tanto el nitrato como el cloruro de calcio son solubles; pero cuando el ejemplar contenga mucha parte caliza, es mejor emplear el ácido crómico. Por lo demás, sus propiedades vienen á ser muy semejantes á las del ácido picro-sulfúrico; pero no son tan fácilmente reemplazados en los tejidos por el alcohol, y por lo tanto convendrá no emplearlos más que en el caso indicado.

5. *Acido crómico.*—El ácido crómico y el alcohol son los dos agentes de endurecimiento más

poderosos que se emplean en la Estación, pero difieren esencialmente en su modo de endurecer. El alcohol debe su efecto á las propiedades deshidratantes y coagulantes, sin que dé origen á combinaciones químicas; mientras que el ácido crómico forma precipitados insolubles con las sustancias de las celdillas, y de aquí el que sea muchas veces difícil colorar bien los ejemplares que han sido endurecidos con este último, aunque en determinadas circunstancias, tales como en la coloración de los núcleos por el método de Flemming, su efecto es favorable.

En la Estación Zoológica se emplea poco el ácido crómico, á no ser en la preparación de ejemplares para museos, pues se da la preferencia al ácido picro-sulfúrico, y luégo se endurece con el alcohol. No obstante, ya sólo, ó bien mezclado con el ácido ósmico, da magníficos resultados para matar y endurecer la mayor parte de animales blandos no contráctiles. Lo mismo que el alcohol, puede usarse rápida ó lentamente.

a.) En el primer caso, se emplea una solución acuosa de $\frac{1}{2}$ á $\frac{4}{5}$ por 100, y se la deja obrar sólo el tiempo necesario para que penetre bien el ejemplar, lo que sucede de ordinario al poco rato después de muerto. Enseguida se pasa al alcohol, de la manera dicha al tratar del ácido picro-sulfúrico. Mr. Lo Bianco, en la preparación de ejemplares para museos, emplea la solución de 1 por 100; pero hay que tener en cuenta que como los animales están en el agua, el título baja á veces hasta la mitad.

El método antiguo de endurecer con el ácido crómico, tal como se encuentra descrito en los tratados de técnica microscópica, está completamente abandonado en la Estación.

b.) El modo de proceder en el método lento, es completamente igual al descrito para el alcohol. La solución que debe emplearse, es del 1 por 100. Da buenos resultados, sobre todo para matar las Ascidias simples y compuestas, y los Pterópodos.

Siempre que se emplee el ácido crómico hay que tener presente que no es líquido conservador, y por lo tanto los objetos deben dejarse en él solamente *el tiempo necesario*; y además que no es completamente reemplazable ni por el agua ni por el alcohol, por más cuidado que se ponga en los lavados. En la preparación de ejemplares para museos se emplea mezclado con una porción de sustancias, tales como el ácido acético, el sublimado, el alcohol, etc. etc., pero sólo trataré particularmente de la mezcla cromosómica y cromo-nítrica, y del líquido de Müller.

**.) *Líquido de Müller y bicromato de potasio.*— En la preparación de ejemplares para museos puede emplearse en algún caso, en lugar del ácido crómico, el bicromato de potasio ó el líquido de Müller, de uso muy común entre los histologistas. Sus efectos son más suaves que los del ácido crómico solo.

La fórmula que reproduzco aquí, es la que se emplea en el Instituto fisiológico de Viena. (Dr. Exner.)

Bicromato de potasio. ($K_2Cr_2O_7$).....	100
Sulfato de sodio. (Na_2SO_4).....	50
Agua.....	5.000

El bicromato adicionado de ácido clorhídrico sirve para matar algunos Nemertinos. (Bicromato $\frac{7}{8}$ y ácido $\frac{1}{8}$.)

6. *Acido cromo-nítrico ó Líquido de Perenyi.*—En la Estación Zoológica no he visto usar este líquido, pero como lo he empleado con buen resultado para preparar huevos y embriones de algunos Salmónidos, creo puede ser de utilidad su conocimiento, y su uso extenderse á otros objetos. Sirve para fijar y endurecer; y huevos preparados con él, muestran perfectamente las diversas fases de segmentación de los núcleos y esferas. Su fórmula, según el Dr. Perenyi, es la siguiente:

Acido nítrico (HNO_3 , 10 por 100)....	4 vol.
Acido crómico (CrO_3 , 0,5 por 100)....	3 vol.
Alcohol.....	3 vol.

Los huevos se dejan cuatro ó cinco horas en este líquido, y luego se pasan á alcoholes de distinto título, hasta el de 70 por 100 si se quieren conservar, ó el absoluto si endurecer. Para colorar *in toto*, el Dr. Perenyi recomienda hacerlo á la vez que se endurece, y para eso mezcla con el líquido ácido una cantidad de sustancia colorante (ordinariamente colores de anilina) disuelta en alcohol. También se puede emplear el carmín borácico.

7. *Acido ósmico.*—El ácido ósmico mata con extrema rapidez, fija los elementos celulares, y endurece los tejidos. Los histólogos le usan además como reactivo colorante por la propiedad que tienen las sustancias grasas de reducir el ósmio.

El Dr. Mayer es poco partidario del ácido ósmico,

prefiriendo, siempre que se pueda, sustituirle por el sublimado corrosivo ó el ácido picro-sulfúrico. Los principales inconvenientes que presenta su uso son: 1.º, despidе vapores venenosos que irritan fuertemente las membranas mucosas de los ojos y boca; 2.º, muchas veces la coloración parda que da á los objetos va aumentando con el tiempo, hasta volverlos negros y opacos; 3.º, no prepara bien los tejidos para ser colorados luégo; 4.º, tiene influencia perjudicial si obra más tiempo que el preciso, y 5.º, su uso es poco cómodo, ya por sus propiedades venenosas, ya también por descomponerse á la luz. A pesar de eso en algunas ocasiones es irremplazable.

Para evitar los efectos tóxicos de los vapores del ácido ósmico, recientemente se ha propuesto el empleo del amido ósmico ($2\text{NH}_3, \text{OsO}_2, \text{H}_2$) que, según parece, tiene las mismas propiedades; más nada puedo decir sobre el particular, porque sólo me he servido del ácido, y en la Estación tampoco se empleaba el amido.

En general puede decirse que todos los animales pequeños, tales como las medusas de los Hidróideos, Traquimedusas, *Ephyras* de los Acalefos y algunos Acalefos mismos, tales como la *Rhizostoma pulmo*, se preparan bien matándolos con el ácido ósmico. Da también muy buenos resultados con los Entomotráceos pielágicos, conservando algunos de ellos el brillo y colores de interferencia que produce su dermato-esqueleto. Tengo varios ejemplares de la preciosa *Sapphirina fulgens*, no rara en el Golfo de

Nápoles, que presentan el mismo brillo y espléndidos colores que el animal vivo. También sirve perfectamente para las formas *Nauplius* y *Zoea* de los Crustáceos, y los estados embrionarios de los Peces y otros Vertebrados, siempre que sean de pequeño tamaño. Según Van Beneden y Whitman es el mejor medio para tratar las *Dicyemidæ*.

En el comercio se vende el ácido ósmico (OsO_4) de gramo en gramo, encerrado en pequeños tubos de cristal soldados á la lámpara, para evitar que se desprendan vapores. La solución más conveniente es de 1 por 100; y el modo de prepararla, para evitar todo peligro, es el siguiente. Se llena de agua destilada un frasco azul de 100 gramos, con tapon esmerilado que cierre perfectamente, y luégo cogiendo por uno de sus extremos el tubo del ácido, con unos alicates, se introduce en el cuello del frasco, y se aprieta con el fin de romperle. De esta manera el ácido, con parte del tubo, cae al fondo sin dar tiempo á que se desprendan vapores. Al poco rato la disolución se habrá efectuado, y está para servir; procurando siempre tenerla al abrigo de la luz, y bien tapada.

El uso del ácido ósmico en solución fuerte, como es el 1 por 100, requiere mucho cuidado y calcular bien el tiempo que ha de obrar; teniendo presente que en el primer momento mata, y luégo endurece y colora. Mr. Lo Bianco lo emplea de la siguiente manera, que yo he seguido con buenos resultados. Supongamos, por ejemplo, que se trata de la *Ephira* de la *Pelagia noctiluca*. Se la coloca en un pe-

queño frasco ó tubo de cristal, lleno hasta la mitad de agua de mar, de modo que pueda moverse con entera libertad, para lo cual le bastarán 10 ó 12 centímetros cúbicos de agua; y de repente se vierten sobre ella dos ó tres centímetros cúbicos de solución (1 por 100). La muerte se producirá instantánea, y á los dos ó tres minutos los tejidos habrán adquirido la dureza suficiente para que el animal pueda ponerse en alcohol sin temor de que pierda la forma. El alcohol deberá cambiarse varias veces, con objeto de eliminar todo lo posible el ácido ósmico, y á la vez se irá aumentando su título hasta el 70 por 100. De esta manera la *Ephira* quedará extendida en su forma natural, y transparente. Si en lugar del ejemplo que acabo de tomar se tratase de otra especie, la cantidad de ácido y el tiempo cambiarían también, en proporción que sólo la práctica enseña. No obstante, pueden darse estas reglas:

1.º No debe emplearse más cantidad de ácido que la necesaria para que produzca el efecto lo más rápidamente posible.

2.º El ejemplar debe permanecer en la solución ósmica sólo el tiempo indispensable para que produzca el efecto deseado.

3.º Por medio de lavados con alcohol se ha de procurar que desaparezcan hasta los últimos residuos del ácido.

Con los animales de algún tamaño, y de difícil penetración, es preferible usar la mezcla cromo-ósmica—de la que luégo hablaré—pues como el ácido ósmico necesita bastante precisión en el tiempo que

ha de obrar, resulta que en las partes periféricas produce ya efectos nocivos, cuando á las centrales aún no ha llegado su acción de un modo conveniente.

El ácido ósmico, lo mismo que el crómico, no es del todo reemplazable por el alcohol, como sucede con el picro-sulfúrico. El ácido ósmico endurece por efecto del precipitado inorgánico que produce en el interior de los tejidos—probablemente de ósmio—que impide la acción de las sustancias colorantes; y por más cuidado que se ponga en quitar las últimas trazas de ácido, raras veces se consigue, y el ejemplar continúa oscureciendo, hasta ponerse algunas veces negro y opaco. Para blanquear á los que esto les haya pasado, se han propuesto varios medios, como el cianuro de potasio, el ferro-cianuro de potasio, etc. etc. y Mr. Certes usa para los Infusorios el amoniaco. En la Estación de Nápoles emplea el Dr. Mayer el cloro, de la siguiente manera. Los objetos que se quieren blanquear se colocan en un frasco lleno de alcohol, de 70 á 90 por 100, y el fondo se cubre con cristales de clorato de potasio, vertiendo luégo, con una pipeta, unas cuantas gotas de ácido nítrico. Enseguida empiezan á desprenderse burbujas de cloro y entonces se agita suavemente el contenido del frasco; y cuando el ejemplar esté blanqueado, se pasa de nuevo á alcohol de 70 á 90 por 100. Me parece que este procedimiento podría modificarse ventajosamente empleando dos frascos unidos por medio de un tubo de cristal. En uno de ellos podría ponerse el clorato de potasio y servir de gasógeno, y en el otro, lleno de alcohol, los

objetos que se quieran blanquear. De esta manera el alcohol no contendría más que el cloro en disolución, y nada de ácido nítrico. Un aparato semejante describe el Dr. Marsh (*Microscopical section Cutting*, Londres 1882) para blanquear las secciones vegetales, con el fin de colorarlas luégo.—Este mismo procedimiento puede seguirse para blanquear ejemplares teñidos por pigmentos naturales.

Según las observaciones del Dr. Mayer, el cloro debe alterar algo la constitución de las celdillas, pues sirviéndose de la *Sapphirina* como *test object*, resulta que pierde sus colores; mas como estos colores son debidos á interferencias de la luz, producidas por la estructura de las celdillas epidérmicas, su desaparición prueba que dicha estructura ha sido modificada, pues de otro modo continuarían viéndose. Otro efecto del blanqueamiento es que los ejemplares se vuelven blandos, y de ahí deduce el Dr. Mayer que el efecto endurecedor del ácido ósmico es debido á los precipitados inorgánicos que se forman en el interior de los tejidos, y que producen además la coloración.

8. *Acido cromo-ósmico*.—Da algunas veces mejores resultados que cualquiera de los dos ácidos separadamente, pues aunque los dos sirven para matar y endurecer, sus propiedades y modo de obrar son diferentes.

El Dr. Max Flesch propone la siguiente fórmula:

Acido ósmico (OsO_4).....	0,10
Acido crómico (CrO_3).....	0,25
Agua.....	100,00

El objeto puede estar en esta solución de 24 á 36 horas; y no hay que tener cuidado de guardarla de la luz, pues no tiene influencia sobre el ácido ósmico. Luégo se trata por el alcohol, después de haberlo lavado con agua.

Mr. Lo Bianco emplea bastante la mezcla de estos dos ácidos en la preparación de ejemplares para museos, sobre todo para matar y endurecer los animales blandos no retráctiles, tales como los Ctenoforos, las formas medusóideas de los Hidróideos, Traquimedusas, Acalefos y *Thaliacea* (Tunicados). El ácido crómico lo emplea á 1 por 100, y la cantidad de ósmico la gradúa según la clase de animal y su tamaño. Para un ejemplar de *Camarina hastata*, de tamaño regular, ó para una *Pelagia noctiluca*, por cada 500 gramos de solución crómica, pone cuatro ó cinco gotas de ácido ósmico (1 por 100) y deja obrar la mezcla por espacio de una hora. Luégo lo pasa á alcohol de 50 por 100, que cambia repetidas veces, aumentando el título hasta 70 por 100. En otros casos, en lugar de emplear la acción simultánea de los dos ácidos, trata el ejemplar primero por el ósmico, y luégo por el crómico, como sucede en la preparación del Cinturón de Venus (*Cestum veneris*). Algunas veces el ácido crómico se sustituye por el bicromato de potasio, como en la *Cassiopeja borbonica*, que después de matarla con el ácido ósmico, se introduce en una disolución de bicromato al 5 por 100, en donde se la deja durante tres ó cuatro días, antes de pasarla al alcohol. De esta manera se obtienen magníficos

ejemplares transparentes, y ligeramente azulados, que materialmente parecen estar vivos.

(La mezcla de:

Acido crómico á 0,25 por 100.....	9 vol.
Acido ósmico á 1 por 100.....	1 vol.

da también buenos resultados para fijar el meristema primitivo de los vegetales).

9. *Sublimado corrosivo*.—Al Dr. Lang, Asistente de la Estación, se debe el uso moderno del sublimado (HgCl_2); y digo moderno, porque hace ya bastantes años (1847) que Blanchard lo empleó para matar gusanos, y también el Dr. Pacini como base de sus líquidos conservadores; pero uno y otro sólo usaban débiles soluciones—el 2 por 100 el Dr. Pacini—; y dicho sea de paso, de esta manera no me ha dado buenos resultados para la conservación de embriones de Salmónidos antes de reabsorber la vesícula umbilical. El método del Dr. Lang consiste en emplear el sublimado en solución concentrada.

Las principales propiedades del sublimado consisten en que mata rápidamente—no cediendo en este punto sino al ácido acético—fija los elementos celulares, y endurece los tejidos, preparándolos muy bien para recibir la coloración. En estos conceptos es superior al ácido ósmico, y también al acético, que sólo debe usarse, como luégo se verá, en casos excepcionales. Lo que debe tenerse en cuenta con el sublimado es su poca solubilidad en el alcohol, y por lo tanto los ejemplares se han de lavar bien con agua antes de introducirlos en este líquido, pues de

No Signum

otra manera cristaliza en forma de agujas, que materialmente diríase son pequeños alfileres con su cabeza, como he tenido ocasión de ver en algunas preparaciones de Planarias del Dr. Lang.

Al estudiar las Planarias con objeto de escribir la monografía de las existentes en el Golfo de Nápoles, empezó el Dr. Lang á usar el sublimado. Al principio lo empleaba según una fórmula en que además entraba la sal común y el ácido acético; mas hoy día, tanto el Dr. Lang, como el Dr. Mayer y Mr. Lo Bianco, sólo usan la solución concentrada, mezclada á veces con ácido acético. En general puede decirse que da buenos resultados siempre que se trate de matar rápidamente; y su acción es tan pronta y enérgica, que los animales contráctiles y retráctiles mueren en completo estado de expansión. Así, encontrará buen empleo para matar Corales, Hidróideos, Anémonas de mar, Equinodermos—siempre que se quiera que los ambulacros queden fuera del caparazón y extendidos—Planarias, Cestódes, Anélidos contráctiles, Cirrípedos, Copepódos, forma *Zoea* de los Decápodos, embriones de vertebrados, etcétera etc. Según Mayer y Giesbrecht—y yo también he tenido ocasión de observarlo—penetra bien la cubierta *chitínosa* de los pequeños Crustáceos, tales como la *Sapphirina* y otros Copepódos.

El sublimado puede emplearse *a)* frío y *b)* caliente, según que haga falta obtener sus efectos con mayor ó menor rapidez. Con los animales muy contráctiles, tales como los Corales é Hidrarios, convendrá usarse hirviendo.

a.) El método operatorio del Dr. Lang para las Planarias, es el siguiente. Los animales se colocan en una fuente de cristal, con agua de mar, separados unos de otros para que puedan extenderse bien, y procurando que la cantidad de agua sea la menor posible. De repente se vierte encima la solución de sublimado (concentrada), teniendo en cuenta que sea en bastante cantidad para que, mezclada con el agua de mar en que están los animales, quede aún la solución muy fuerte, y se la deja obrar por 15 ó 20 minutos. Luégo se lavan bien las Planarias con agua, y una á una se pasan á otra fuente con alcohol de 50 por 100, colocándolas de plano y bien extendidas. Al poco rato se cambia el alcohol por otro de 60, y después de 70 por 100, en el que se guardan.

b.) Mr. Salvatore emplea para las mismas Planarias la solución concentrada de sublimado hirviendo, operando de la misma manera que el Doctor Lang; pero como la muerte se produce instantánea, y el sublimado hirviendo podría alterar los tejidos, enseguida se las pasa á una fuente de agua fría, cogiéndolas, una á una, por medio de una espátula; y después de bien lavadas se tratan por el alcohol, de la manera ordinaria. El mismo procedimiento se emplea con los Hidrarios, Corales, *Pennatula...* etcétera etc., teniendo mucho cuidado que en el acto de verter el sublimado los pólipos tengan su corona de tentáculos bien abierta.

Algunas veces, ya para producir más rápidamente la muerte, ó para que los tejidos no queden

tan opacos, se emplea mezclado con ácido acético, por partes iguales. En general, puede decirse, que el sublimado da mejores resultados para tratar los ejemplares que se quieran someter al examen microscópico, que para los destinados á museos, á causa de la opacidad que produce. Su empleo es cómodo y barato, necesita poco tiempo, y dispone los tejidos para una buena coloración bien diferenciada, circunstancias todas muy recomendables.

10. *Líquido de Merkel*.—El Dr. Hugo Eisig, Jefe del Laboratorio de la Estación, lo emplea con éxito para preparar los órganos delicados de los Anélidos. Su composición es:

Cloruro de platino (PtCl_4) á 1:400... 1 vol.
 Acido crómico (CrO_3) á 1:400..... 1 vol.

Los ejemplares se dejan en este líquido de tres á cinco horas, y luego se pasan al alcohol, del modo ordinario. Con los pequeños Anélidos basta una hora de inmersión.

El Dr. Whitman ha modificado recientemente este procedimiento, para tratar los huevos de animales pielágicos; y puede verse la descripción en el «American Naturalist» (año 1883).

11. *Acido acético*.—En la microquímica animal, y lo mismo en la vegetal, se emplea el ácido acético ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$) por la propiedad que tiene de hacer muy visibles los núcleos, y de hinchar el tejido conectivo; pero como mi objeto no es estudiar los reactivos histológicos, sino el modo de preparar los ejemplares para el estudio micrográfico, no me detendré

en estudiar esas propiedades, que constituyen en el caso presente un defecto, que deberá tenerse en cuenta siempre que se use este ácido como medio para matar.

El ácido acético mata tan rápidamente los animales marinos, que aun los más contráctiles, y que tienen bránquias, tentáculos ú otras partes de su cuerpo excesivamente retráctiles, quedan en estado de expansión. En este concepto es superior al sublimado corrosivo, y sería de un uso muy general si no presentase los inconvenientes que acabo de señalar. Por eso deberá evitarse en la preparación de ejemplares destinados á la observación microscópica, pues siempre los tejidos estarán más ó menos alterados; pero si son para museos, los resultados son perfectos, pues tiene además otra propiedad, muy buena en este caso, cual es la de darles transparencia.

El ácido acético podrá usarse para matar todos los animales con apéndices retráctiles, como los Alciónidos, Zoantários, Hidrários, Holoturias, etc., etcétera. El procedimiento que se debe seguir es análogo al del sublimado: esperar á que el animal se encuentre en completo estado de expansión, colocado en la menor cantidad posible de agua, verter de repente el ácido, y enseguida pasarlo al alcohol con el fin de que se endurezca, ó bien á una mezcla de este líquido y ácido crómico—1 por 100, y partes iguales—si el alcohol sólo no basta.

Debe tenerse muy en cuenta que el ácido acético sólo ha de obrar el tiempo *puramente indispen-*

sable. Algunas veces Mr. Lo Bianco lo emplea mezclado con el ácido ósmico, para evitar que los tejidos se ablanden demasiado; y otras, con objeto de que los ejemplares queden transparentes (preparación para museos), lo añade al ácido crómico y al sublimado. ($\frac{1}{8}$ de ácido acético).

El ácido piroleñoso puede sustituir en algunos casos al acético. Sus efectos no son tan rápidos, pero hincha y ablanda ménos los tejidos.

12. *Agua dulce*.—Se emplea en la Estación (H_2O) para matar los crustáceos *Carida*, *Macroura* y *Brachyura*, cuando se quiere estudiar sus bránquias, y también para los Equinodermos ofúridos. Enseguida de muertos se pasan á alcohol, que debe cambiarse varias veces.

El efecto del agua dulce en los animales marinos ha sido recientemente estudiada por Mr. Varigny (*Comptes Rendus*, xcviII, 1883), y antes lo fué por Mr. Plateau, en una memoria premiada por la Real Academia belga (año 1870). Parece que los animales mueren por falta de cloruro de sodio, y sobre todo por una fuerte acción endosmótica que hincha y extiende las bránquias; y en los Peces y Crustáceos, detiene la circulación, y además vuelve opaca la capa de epitelio que las recubre.

13. *Humo de tabaco*.—Después de haber ensayado, sin resultados satisfactorios, el cloroformo y otros anestésicos, Mr. Lo Bianco y el Dr. Andrés emplean el humo de tabaco para inmovilizar las Actinias. Para ello se coloca el vaso que contiene el animal en una fuente circular, y se cubre con una

campana de cristal, de diámetro algo menor que el de la fuente, en la que se pone un poco de agua con objeto de cerrar la atmósfera circunscrita por la campana. Luégo, por medio de un tubo, se inyecta debajo de ella humo de tabaco, que poco á poco va disolviéndose en el agua del vaso, y produce su efecto narcótico en la Actinia, que al poco tiempo queda inmóvil é insensible, con toda la corona de tentáculos extendida. Entonces se la puede matar con el sublimado ó el ácido picro-sulfúrico. De este modo se obtienen muy buenos resultados, y es de la única manera que queda bien la *Calliac-tis effoeta*. Es bueno también poner debajo de la campana un pequeño frasco con cloroformo.

14. *Acido carbónico*.—Termino la lista de los medios y procedimientos para matar y fijar los animales, señalando las experiencias del Dr. Fol sobre los efectos narcóticos del ácido carbónico (CO₂). Según dicho doctor (*Zool. Anzeig.*, v, 1882, p. 698 y *Bull. Soc. Belg. Micr.*, ix, 1882, p. 35) si se satura de ácido carbónico el agua de mar en que está nadando una Medusa, enseguida queda inmóvil en su forma y posición natural; y si se cierra herméticamente el frasco que la contiene, de modo que no pueda escaparse el ácido, continúa de esta manera horas, y aún días, volviendo á la vida tan pronto como se la cambia de agua. Las Estrellas de mar pueden estar inmóviles hasta cuatro días, y continúan viviendo perfectamente cambiándoles el agua.

El Dr. H. Fol llama la atención de los naturalistas sobre las ventajas que ofrece su procedimiento

para dibujar y fotografiar animales que están en continuo movimiento; y claro está que puede tenerlas también en la preparación de animales muy contráctiles. Yo no lo conozco prácticamente; y aunque los resultados obtenidos por Mr. Lo Bianco, según él mismo me ha comunicado, no están del todo conformes con los del Dr. Fol, le señaló aquí porque merece estudiarse.

Para emplear con fruto los métodos y sustancias cuyas principales propiedades acabo de enumerar, deben tenerse en cuenta las siguientes indicaciones:

1.º Todos los líquidos sólo han obrar el tiempo indispensable para producir el efecto deseado, excepto el alcohol y el ácido picro-sulfúrico, en los que no hay inconveniente en dejar que el ejemplar permanezca por un tiempo indefinido.

2.º Excepto los dos líquidos que acabo de señalar, todos los demás tienen una influencia perjudicial si no se tiene cuidado de eliminarlos bien de los tejidos, sobre todo los ácidos ósmico, crómico, acético, y el sublimado. El ácido crómico vuelve quebradizos los objetos; el ósmico los ennegrece; el acético los ablanda é hincha; y el sublimado los vuelve opacos, y cristaliza en forma de agujas entre los elementos celulares.

3.º La eliminación de estas sustancias se hará por medio de lavados sucesivos con alcohol, excepto con el sublimado, que conviene lavar antes el ejemplar una ó dos veces con agua.

4.º El alcohol ácido y yodado, el ácido picro-

sulfúrico y el acético son completamente reemplazables por el alcohol. No así el ácido ósmico, crómico y sublimado.

5.º Todos los métodos expuestos anteriormente suponen que terminan por la conservación en el alcohol.

6.º Al pasar un objeto de un líquido acuoso al alcohol debe tenerse en cuenta el efecto de la ósmosis. Por eso se empezará por alcohol de 40 ó 50 por 100, y después de algunas horas, según el tamaño del animal, se cambiará por otro cuyo tanto por 100 sea mayor, y así sucesivamente. De ordinario bastarán, para pasar un animal delicado desde un líquido acuoso al alcohol de 70 por 100, los cambios de 10 en 10 por 100, empezando por 40 ó 50. La misma regla se observará si se quiere continuar hasta el alcohol absoluto.

7.º El alcohol debe siempre emplearse en abundancia.

Líquidos conservadores.—Al tratar del alcohol como medio de matar y endurecer, he dicho también que en la Estación de Nápoles era el único líquido que se empleaba para conservar, pues después de muchas experiencias y ensayos, ninguno daba tan buenos resultados. Para que realmente sea un buen líquido conservador debe reunir estas condiciones:

1.^a Penetrar perfectamente los tejidos del animal. Esto se consigue siempre con los procedimientos anteriormente expuestos; pero no cuando los

animales se introducen directamente en alcohol, por las razones que quedan expuestas al tratar de este líquido.

2.^a Que el alcohol no contenga sustancias extrañas. Siempre que se sigan los procedimientos antes descritos, esta condición queda satisfecha, á causa de los frecuentes cambios de líquidos que se hacen, con objeto de eliminar todo lo más posible las sustancias que han servido para matar.

3.^a Que el alcohol sea de un tanto por 100 conveniente para que los tejidos estén duros, y no entren en maceración. De ordinario ese tanto por 100 deberá ser de 70, que es el que tiene generalmente en los magníficos ejemplares que se preparan en la Estación de Nápoles. Siempre que se introduce un animal directamente en alcohol, sin previa preparación, el tanto por 100 baja, á causa de los líquidos acuosos contenidos dentro de su cuerpo, y el alcohol entonces, además de mayor cantidad de agua que la conveniente, tendrá una porción de sales y sustancias orgánicas en disolución y suspensión, que impedirán produzca sus efectos conservadores. Esto se evita con los cambios frecuentes de líquido, y el aumento progresivo de su tanto por 100.

Muchos son los líquidos que hasta ahora han sido propuestos para la conservación de animales y vegetales, pero todos ellos de resultado dudoso en preparaciones permanentes. Uno de los que recientemente ha adquirido cierto renombre, por haber sido publicada su fórmula por el Ministro de Instrucción de Prusia, después de haber comprado el

secreto á su inventor, es el líquido de Wickersheimer. Se compone según el *Zoologischer Anzeiger* (II, 1879) de

Alumbre ($\text{Al}_2\text{S}_3\text{O}_{12}, \text{K}_2\text{SO}_4 + 24 \text{ Aq.}$).....	100 gr.
Sal común (NaCl).....	25 gr.
Salitre (KNO_3).....	12 gr.
Carbonato de potasio (K_2CO_3).....	60 gr.
Acido arsenioso (AsO_3).....	10 gr.

disuelto todo en tres litros de agua hirviendo. Después de fría la solución se filtra, y á cada diez partes se le añaden cuatro de glicerina y una de alcohol. Según su autor, da los mejores resultados tanto en sustancias animales como vegetales, que conserva durante muchos años, sin endurecer y con toda la flexibilidad; mas algo debió encontrar que faltaba á su fórmula Her Wickersheimer, cuando al año siguiente la modificó, convencido de que un mismo líquido no podía servir para todos los objetos; y propuso cuatro en vez de uno. Pueden verse las instrucciones para su uso en el *Journal of the Royal Microscopical Society* (Octubre de 1880, página 855); y no entro en más detalles porque nada puedo decir por experiencia propia; y los resultados obtenidos por algunas personas que conozco lo han empleado, están muy lejos de estar conformes.

A veces, durante la disección de algún ejemplar, no conviene usar el alcohol para que no endurezca los tejidos. Entónces podrá usarse, con buen resultado, el ácido picro-sulfúrico diluido, ó una solución débil de ácido fénico ó de hidrato de cloral—

uno ó dos decigramos en 200 centímetros cúbicos de agua.

Antes de terminar esta parte de mi trabajo, y como aplicación de los procedimientos que he descrito, indicaré el tratamiento que se debe emplear con algunos animales, según las notas que tomé en la Estación; y así, por analogía, se podrá determinar el procedimiento que mejor convendrá seguir en cada caso particular.

Protozoários.

Poco me resta que decir aquí después del capítulo aparte que he dedicado á este heterogéneo Tipo de animales. Los Schizomicetos, Mixomicetos y Flagelados deben tratarse con preferencia por el ácido ósmico. En la actualidad son muchos los procedimientos que en todas las revistas de microscopia pura, ó aplicada á la medicina, se encuentran para preparar las Bacterias patógenas, y sobre todo la de la tuberculosis, pero no creo sea del caso describirlos aquí. Para algunos Flagelados, tales como la *Euglena viridis*, lo mismo que para las Algas inferiores, siempre me he servido del ácido ósmico con buenos resultados. El alcohol yodado se emplea en la Estación para los Radiolarios, y el ácido picrosulfúrico para los Infusorios (Dr. Entz). Debe, no obstante, tenerse presente que la Clase de los Infusorios comprende animales muy diferentes, algunos en extremo contráctiles y otros no; algunos con el cuerpo desnudo y otros protegidos por una loriga ó

coraza *chitínosa* etc., etc.; y por lo tanto, será mejor echar mano de diversos procedimientos, según el caso, que adoptar uno exclusivo.

Según Mc. Murrich, con el sublimado se obtienen también buenos resultados.

Celenterados.

A.—ESPONJAS.—El Dr. Vosmaer, en la preparación de los Espongiarios del Golfo de Nápoles, empleaba de ordinario el método del alcohol rápido, y á veces también el ácido picro-sulfúrico. Las esponjas de color tiñen el alcohol y se decoloran. La *Aplysia æerophoba*, por ejemplo, que es de un hermoso color de azufre, cambia primero en azul y después en morado vinoso; y la *Axinella cinnamomea*, amarilla, y la *polypoides*, de un vivo rojo de coral, pierden por completo el color. Cuando no se quiere estudiar la histología, sino la forma general, ó se destinan los ejemplares para museos, bastará secarlas al aire libre.

B.—ANTOZOARIOS.—*Alcionarios ó Corales*.—Los tres tipos de animales que pertenecen á este Orden son iguales para el objeto que nos ocupa. Los Alciónidos, lo mismo que las Pennátulas y Gorgónidos, al salir del agua contraen los pólipos y los introducen dentro del cuerpo, si es este blando, hasta el punto de que en el *Alcyonium palmatum*, común en los mares del Norte y también en el Golfo de Nápoles, ni siquiera se sospecharía su existencia. «Manos de muerto» le llaman los marineros, y no

les falta razón, pues efectivamente aquella masa carnosa de color rosado, está lobulada simulando los dedos de la mano; pero si se coloca en un *aquarium* con agua corriente, se verá que poco á poco cambia de aspecto y se cubre de florecillas blancas, á manera de florido almendro antes de la salida de las hojas. Al menor movimiento vuelven los pólipos á cerrarse y á introducirse dentro del tronco. Es preciso, pues, para matarlos en estado de expansión, recurrir á los medios más rápidos, como son el ácido acético ó el sublimado hirviendo; pero debe hacerse la operación con suma prontitud para no dar tiempo á que los pólipos se contraigan. En igual caso están los demás Alciónidos, tales como: *Sympodium coralloides* y *Paralcyonium elegans*. De esta manera se obtienen también magníficas preparaciones de los Pennatúlidos: *Pennatula fosforea*, *Funicularia funiculina*, *Pteroides spinulosus*, *Veretillum pusillum*, etc., etc., y de los Gorgónidos: *Corallium rubrum*, *Gorgonia verrucosa*, *Gorgonella sarmentosa*, *Isis elongata*, etc., etc. Si los ejemplares se destinan á museos, convendrá mejor emplear el ácido acético, porque da más transparencia; y para evitar en algunos casos que ablande demasiado el animal, —(*Paralcyonium* y *Pteroides*)— puede adicionarse con algunas gotas de ácido ósmico.

Zoantários.—En este Orden hay que distinguir dos tipos: Las Actinias, y los Antipatarios y Madréporas. Las Actinias ó Anémonas de mar, son siempre animales blandos, no reunidos en colonias, y enteramente desprovistos de ejes sólidos. A causa de

su contractilidad, blandura de su cuerpo, facilidad en descomponerse y resistencia á la muerte, es bastante incierto su tratamiento. El Dr. Andrés, autor de la Monografía de las Actinias del Golfo de Nápoles, ha publicado en una nota de su memoria *Intorno all' Edwardsia Claparedii*, los mejores procedimientos para matar y endurecer las Actinias empleados por él y Mr. Lo Bianco, procedimientos que he tenido ocasión de ver prácticamente.

La contractilidad de las diferentes especies de Actinias es muy diferente, pues mientras unas, tales como la *Actinia Cari*, *equina*, *Hyanthus*, *diaphanus* y *Adamsia palliata*, tienen los tentáculos retráctiles, otras nó, como la *Anthea cereus*, *Cladactis Costae* y *Cereactis aurantiaca*. El cuerpo de esta última, en cambio, es sumamente contráctil. Después de repetidas experiencias, el Dr. Andrés encuentra buenos para matar las Actinias, el sublimado, la mezcla glicerino-alcohólica ó bien el alcohol y el ácido picro-sulfúrico, después de haberlas inmovilizado con el humo de tabaco, ó la nicotina, (un gramo en un litro de agua de mar) que se hace pasar lentamente al vaso en donde se encuentra el animal. Las especies pequeñas quedan bien empleando el sublimado caliente, pero cuando son grandes es preciso inyectárselo dentro del cuerpo, para evitar la contracción. El cloroformo y otros anestésicos tienen tan poca acción, que el animal empieza á descomponerse en algunos puntos, antes de perder por completo la sensibilidad en otros. También ha empleado el Dr. Andrés, con bastante

buen resultado, el congelar al animal en estado de expansión.

Mr. Lo Bianco emplea el ácido acético, ó el sublimado hirviendo, para estas especies:

Actinia equina.

» *Cari.*

Adamsia palliata.

Aiptasia camaeleon.

Cereanthus membranaceus.

» *solitarius.*

Edwardsia Claparedii.

Las tres últimas dan mejores resultados con el ácido acético. Las especies poco retráctiles, como la *Anthea cereus*, pueden matarse con una mezcla—partes iguales—de ácido crómico y picro-sulfúrico. La *Cereactis aurantiaca* y la *Cladactis Costae*, van bien con una mezcla de sublimado y ácido crómico, á la que puede añadirse unas gotas de ácido ósmico. Para la *Calliactis effoeta* es preciso recurrir al procedimiento del humo de tabaco.

Para los Antipatarios y Madréporas, deben tomarse iguales precauciones que para los Alcionarios, y el tratamiento mas conveniente es el del sublimado frío ó hirviendo, según su mayor ó menor contractilidad. De esta manera quedan muy bien las siguientes especies del Golfo de Nápoles:

Dendrophyllia ramea.

Antipathes larix.

Astroides calycularis.

Cladocora caespitosa.

Caryophyllia cyatus.

C.—HIDROMEDUSAS.—*Hidróideos.*—En los Hidróideos Tubularios y Campanularios hay que distinguir las formas polipóideas ó ágamas, y las formas medusóides ó sexuadas. Para matar las primeras se empleará siempre el sublimado, colocando antes el ejemplar en agua corriente, á fin de que los pólipos extiendan bien los tentáculos. Con las medusas, si son del tipo de las Oceánidas, como sucede con casi todas las pertenecientes á los Tubularios, hay que emplear un método para que los filamentos marginales quedén extendidos, y no arrollados como suele ponerlos el animal en estado de contracción. Para lograr esto, nada mejor que el ácido acético seguido del endurecimiento inmediato por medio de una mezcla de ácido crómico y alcohol—partes iguales. De esta manera se obtienen muy buenas preparaciones de la *Oceania pileata* y *conica*, *Lizzia Koeilikeri*, *Bougainvillia spec.*, *Podocoryne carnea*, *Sincoryne spec.*, etc. La *Oceania conica*, muy contráctil, puede también matarse lentamente con alcohol.

A las medusas pertenecientes á los Campanularios, por lo general más pequeñas que las anteriores, les convendrá mejor el tratamiento del ácido ósmico. De las que se encuentran en el Golfo de Nápoles, he preparado de esta manera buenos ejemplares de *Obelia geniculata*, *Clytia Johnstonii* y *Tima flavi-*

labris. Las especies de *Aequorea* van mejor con ácido crómico, adicionado de $\frac{1}{8}$ de ácido acético.

Para las Traquimedusas conviene el ácido ósmico sólo, ó bien mezclado con el crómico. La *Cunia rhododactyla* y la *Liriope exigua* deben tratarse por el ácido ósmico, y la *Aegineta flavescens*, *Aeginopsis mediterranea* y *Camarina hastata* por la mezcla cromo-ósmica.

Sifonoforos.—Es sensible que unos animales de un tipo tan poco común, y cuyas especies, en medio de sus extrañas formas, revisten en algunos casos la mas exquisita esbeltez y belleza, sean tan difíciles de preparar. La principal dificultad consiste en que al tratar de matarlos se desarticulan las vejigas natatorias, filamentos y pólipos, y queda el ejemplar descompuesto. A pesar de esto, Mr. Lo Bianco ha conseguido hacer buenas preparaciones de Sifonoforos, como lo prueban los magníficos ejemplares de *Physophora hydrostatica* y otras especies, que se admiran en casi todos los museos de Europa. Cuando la facilidad de desarticulación no existe, como sucede en los Velélidos.—*Velella spirans* y *Porpita mediterranea*, del Golfo de Nápoles—su preparación es fácil por medio de una mezcla de ácido crómico y pírico.

Acalefos.—La preparación de las especies de este Orden es igual á la de las Traquimedusas: unas van bien con el ácido ósmico, y otras con la mezcla cromo-ósmica. La *Rhizostoma pulmo* y las especies de *Nausithoe*, se tratan con el ácido ósmico, y la *Pelagia noctiluca*, con la mezcla cromo-ósmica. La

Cassiopeja borbonica no da resultado con ninguno de estos dos procedimientos, pero queda bien tratándola primero por el ácido ósmico, hasta que empieza á tomar color, y luego por una disolución de bicromato de potasio á 5 por 100, en la que se deja dos ó tres días, y luego se pasa al alcohol.

Las *Ephyra* de estas especies pueden matarse indistintamente con ácido ósmico, sublimado ó mezcla cromo-ósmica. De las tres maneras he obtenido buenas preparaciones de *Pelagia noctiluca* (*Ephyra*), bastante común en el Golfo.

C.—CTENÓFOROS.—En general los Ctenóforos pueden tratarse por una mezcla de ácido crómico y ósmico (cuatro ó cinco gotas de ósmico por cada 200 centímetros cúbicos de ácido crómico á 1 por 100), y quedan perfectamente (*Beroe ovata*). Al *Cestum veneris* y al *Vexillum paralelum* es mejor matarlos con la solución ósmica, y pasarlos luego á la crómica. Las especies pequeñas pueden matarse con el sublimado, adicionado con unas gotas de ácido acético. La *Callianira bialata*, mejor que con los procedimientos anteriores, va con una mezcla de ácido piroleñoso, crómico y sublimado en partes iguales.

Equinodermos.

Los Crinóideos (*Comatula mediterranea*) se matan con alcohol de 70 por 100, lo mismo que los Asteróideos, Astéridos y Erizos de mar. Los Ofiúridos, para que no se desarticulen, conviene matar-



l etc.

W. : H. :
10/10/100

35 a 100

by 20

10/10/100

los con agua dulce. De esta manera sólo se obtienen ejemplares con los piés, chupadores ó ambulacros, contraídos debajo del caparazon. Si se quiere que queden éstos salientes y extendidos, como los tiene el animal cuando anda ó sujeta su presa, es preciso emplear un modo rápido de matarlos, pues son excesivamente retráctiles. Para ello podrá servir el sublimado.

Las Holoturias se matan también rápidamente á causa de la contractilidad de sus tentáculos bucales y ambulacros. Se espera á que el animal tenga los tentáculos bien estirados; y entonces, cogiéndole con dos dedos por medio del cuerpo, se aprieta bien para impedir que los contraiga, y se introducen por un momento en ácido acético, y luego se mete todo el ejemplar en alcohol; pero no sin que antes se le haya inyectado este líquido dentro del cuerpo.

Los *Balanoglossus*, que Claus coloca después de las Holoturias, se tratan por el ácido picro-sulfúrico.

Gusanos.

Este Tipo de animales es numerosísimo, y como sólo puedo referirme á las especies que se encuentran en el Golfo de Nápoles, resulta que las indicaciones que podré dar sobre el modo de matarlos y prepararlos serán muy incompletas. Pasando por alto los Cestodes, que no tienen especies marinas, los Turbelarios y Trematodes se preparan por medio del sublimado hirviendo ó frío, del mismo modo que el Dr. Lang lo usa para las Planarias; y los

Nemertinos se matan por el método del alcohol lentamente, excepto algunas especies de *Cerebratulus*, tales como las *marginatus* y *pantherinus*, que van mejor con una mezcla de $\frac{7}{8}$ de bicromato de potasio, y $\frac{1}{8}$ de ácido clorhídrico.

Para las especies pequeñas de Nematodes, y toda la Clase de los Rotíferos, siempre de tamaño microscópico, deben emplearse los procedimientos dados para los Infusorios.

Los Gefirianos *Phascolosoma spec.*, *Phoronis hippocrepis* y *Sipunculus nudus* y *tessellatus*, se matan y endurecen con el ácido crómico; y el *Aspidosiphon Muellerei* y *Bonellia viridis* y *fuliginosa* con el ácido picro-sulfúrico.

Los Quetópodos Poliquetos comprenden una porción de Anélidos, casi todos marinos y abundantes en el Golfo. Para nuestro objeto pueden dividirse en varios grupos. Los que no son contráctiles y tienen el cuerpo duro, como la *Aphrodite aculeata* y *Hermione hystrix*, y recubierto de rígidas cerdas de brillantes colores metálicos, se ponen directamente en alcohol, con las precauciones anteriormente dichas. De esta manera los colores se conservan perfectamente, é igual tratamiento conviene á la *Hesione sicula* y á las especies de *Myzostomum* que se encuentran en el Golfo.

Los Anélidos pielágicos, delicados y transparentes, como son la *Alciopa Cantrainii*, *Alciopina parasitica*, *Vanadis formosa* y *Asterope candida* (Familia Alciopidae) se matarán con el alcohol yodado.

Viene luégo un grupo—que da su contingente lo

mismo á los Tubículas que á los Errantes—de aparato branquial muy desarrollado, compuesto de numerosos cirros ó tentáculos dotados de gran motilidad. Los sedentarios se incluyen en las familias de los Serpúlidos y Trebélidos, cuyos animales, encerrados en el tubo que ellos mismos se fabrican, asoman la cabeza por la extremidad superior, desplegando tal lujo de bránquias, que materialmente parecen un árbol en miniatura. Sus representantes más comunes y notables del Golfo de Nápoles son los siguientes:

Terebella Meckelii.

Spirograpis Spallanzanii.

Sabella Salmacidis.

Dasychone luculana.

Protula intestinum.

Serpula Philippi.

Entre los Errantes, merecen incluirse en este grupo, por el gran desarrollo y contractilidad del aparato branquial, las siguientes especies de la familia de las Eunícidas:

Onuphis Pancerii.

» *tubicola.*

Eunice vittata.

» *Claparedii.*

» *gigantea.*

» *siciliensis.*

» *violacea.*

El modo de matar estos animales para que, en los primeros el aparato branquial quede fuera del tubo, y en estado de expansión en ambos, ha de ser con alguno de los métodos más rápidos. Mr. Ló Bianco emplea el sublimado, y operando bien, y con rapidez, llega á obtener magníficas preparaciones, como he tenido ocasión de ver en varias de las especies citadas, y sobre todo en la preciosa *Spirographis Spallanzanii*.

Todos los demás Anélidos que se encuentran en el Golfo, y que figuran en la lista de especies que he apuntado anteriormente, se matan en la Estación por el método del Dr. Eisig, ó sea del alcohol lentamente. De esta manera los ejemplares quedan extendidos en su natural estado de expansión, si bien casi todos ellos pierden los magníficos colores que les adornan en vida. Según ya he dicho en su sitio, este método no presenta los inconvenientes del alcohol usado del modo ordinario. El *Chaetopterus variopedatus*, *Sternaspis thalassemoides* y *Sabellaria alveolata*, mejor que con el alcohol lento quedan con el ácido crómico.

Crustáceos.

Los Entomostráceos pequeños de agua dulce, tales como los *Cypris*, *Daphnia*, *Cypredina*, *Cyclops*, etcétera, los he tratado con buenos resultados por el ácido ósmico. Unas gotas de solución al 1 por 100, en un tubo de cristal en donde están los ejemplares con un poco de agua, bastan para matarlos

rápida y endurecerlos lo bastante. También puede emplearse el ácido picro-sulfúrico.

Los Copepódos marinos se matan en la Estación, por regla general, con el sublimado. Algunas especies, no obstante, tales como la *Copilia denticulata*, *Hyalophyllum pellucidum* y *vitreum*, y *Sapphirina fulgens* van mejor con el ácido ósmico, que conserva perfectamente el tejido epidérmico, en el que reside la estructura que produce, por interferencia, los magníficos colores de que algunas especies están adornadas.

Los Cirrípedos se matan rápidamente con sublimado, y de esta manera se obtienen ejemplares con los cirros extendidos fuera de la concha que los protege.

Los Anfípodos, Isópodos y Stomatópodos se ponen directamente en alcohol, y también todos los Decápodos cuando se preparan para museos; mas si se desea estudiar las bránquias, es preciso matarlos con agua dulce, por las razones expuestas al tratar de ese procedimiento.

Hay que tener en cuenta, según hace observar el Dr. Mayer (véase proc. núm. 1), que el alcohol da origen á precipitados que sueldan entre sí los artículos de los pequeños Crustáceos, y principalmente de los Anfípodos é Isópodos, hasta el punto de romperse al querer moverlos. Para evitar esto convendrá matarlos con el ácido picro-sulfúrico ó picro-nítrico, ó bien con el alcohol ácido.

Las larvas de los Crustáceos—*Zoea*, *Naupilus*, *Phyllostoma*—se pueden tratar por el sublimado,

ácido ósmico ó pico-sulfúrico, según los casos.

Los *Pygogonidios* se introducen primero en ácido crómico (0,25 por 100), y luego se pasan al alcohol (1).

Moluscos.

Lamelibranchios. — Los Moluscos Lamelibranchios al sacarlos del agua encogen los sifones y el pié (*Siphonata*), cierran las valvas, y mueren en esta forma; y si á viva fuerza se abre la concha, suele desgarrarse el manto, y es sumamente difícil, si no imposible, estirar el pié y los sifones. Para matarlos con la concha abierta y el cuerpo en expansión, bastará emplear el procedimiento del alcohol lentamente, ó de la mezcla glicero-alcohólica. A medida que la difusión de este líquido en el agua de mar se efectúa, el animal va abriendo, poco á poco, las valvas, luego saca los sifones y el pié, los estira tanto como puede, y queda en esta postura inmóvil é insensible hasta que muere. Cuando ya ha perdido por completo la sensibilidad, se puede continuar vertiendo alcohol poco á poco hasta matarle, ó bien introducirle en ácido pico-sulfúrico. Debe tenerse cuidado en verter el alcohol muy lentamente, y en

(1) Mr. Frenzel, que ha trabajado en la Estación después de mi permanencia en ella, recomienda, además de los métodos expuestos, el alcohol caliente ó bien adicionado con unas gotas de tintura de yodo, aunque este último medio no conserva bien los núcleos de las celdillas. Para los Isópodos prefiere el líquido de Kleinenberg. (*M. T. Zool. Stat. Neapel*, v (1884), p. 3.)

muy poca cantidad cada vez, pues el animal quedará tanto más extendido, y con las valvas más abiertas, cuanto más lentamente se proceda á darle muerte.

Gastrópodos.—Los Psorobranquios presentan las mismas dificultades que los Lamelibránquios. Contraen gran parte de su cuerpo—manto, pié, cabeza, tentáculos—dentro de la concha, y mueren de esta manera. El alcohol lentamente, como en el caso anterior, da á veces—no siempre—buen resultado, y debe ensayarse. Tal vez también en algunas especies se podrían obtener ejemplares en estado de expansión, empleando alguno de los medios de matar rápidamente.

Respecto á los Pulmonados nada puedo decir porque, como son animales terrestres ó de agua dulce, nada he visto en la Estación de Nápoles, y yo tampoco he hecho experiencia alguna con ellos.

Los Heterópodos son todos animales pielágicos, y como la mayoría de éstos, blandos y transparentes. Para matarlos puede señalarse como método general el ácido cromo-ósrico, pues no siendo contráctiles, y sí muy blandos, hay que tratar de endurecerlos ante todo. De esta manera queda bien la *Pterotrachea mutica* y *coronata* y la *Firoloides Desmarestii*. Para la *Carinaria mediterranea* Mr. Salvatore Lo Bianco prefiere el sublimado, y el alcohol para la *Atlanta Peronii*. Debe tenerse muy en cuenta, que siendo los Heterópodos blandos y transparentes, si no se tiene cuidado, el alcohol produce en ellos contracción, y para evitarlo se tomarán las

precauciones señaladas al describir los métodos generales.

El Orden de los Gastrópodos Opistobranquios (*Opisthobranchia*) se divide en dos grupos: los Tectibránquios, y los Dermatobránquios. Los primeros pueden considerarse como el tipo de los animales blandos no retráctiles; y el tratamiento más conveniente será el del ácido crómico, con el que pueden matarse las siguientes especies, que dan también buen resultado con el picro-sulfúrico.

Gastropteron Meckelii.

Philine aperta.

Aplysia depilans.

» *leporina*.

Pleurobranchus aurantiacus.

» *testudinarius*.

Pleurophyllidia lineata.

El *Doridium Aplysiaeforme* hace excepción, y le conviene el tratamiento del grupo siguiente.

Los Dermatobránquios Gymnobránquios, sin concha, con apéndices cutáneos, y las bránquias en el dorso, pertenecen al grupo de los animales blandos, contráctiles, y con apéndices retráctiles. Convendrá matarlos del modo más rápido que se pueda, empleando el ácido acético si los ejemplares se destinan á museos, ó el sublimado hirviendo en el caso de querer estudiar su histología. Las especies del Golfo de Nápoles que en la Estación se preparan de estas dos maneras son:

Doris tuberculata.

Polycera quadrilineata.

Tritonia tethydea.

Tethys leporina.

Aeolis spec.

Fiona nobilis.

Janus cristatus.

La *Tethys leporina* debe prepararse siempre que se pueda con el ácido acético.

La *Phylliroe bucephalum*, aunque perteneciente á este grupo, tiene un tratamiento diferente. Es un animal de dos á tres centímetros, muy transparente y blando, sin bránquias, y con sólo dos tentáculos. Su cuerpo despidе luz en la oscuridad, y es uno de los animales que contribuyen á la fosforescencia del Mediterráneo en las noches tranquilas del verano. Para matarle lo mejor es verter unas gotas de ácido ósmico en el vaso en donde está el animal, y no pasarle al alcohol hasta que se haya endurecido lo suficiente.

En la clasificación de los Gastrópodos se hace mucho uso de los caracteres que suministra el aparato dentario ó rádula. Para aislarla y separarla de los músculos y parte carnosa que la rodea, hay un procedimiento muy sencillo, que consiste en cortar la cabeza y parte del cuello al animal, y ponerla en un tubo de cristal con un poco de agua y unos trocitos de potasa cáustica. Después de unas cuantas horas la parte carnosa, medio disuelta, se desprenderá de la rádula, que se limpiará con un pincel y

agua, pasándola luego al alcohol para teñirla y montarla de un modo conveniente. De esta manera he preparado las rádulas de varias especies, que después de coloradas por el picro-carmín, y montadas en bálsamo, presentan hasta los más pequeños detalles.

Pterópodos.—Constituyen otro tipo de Moluscos compuesto de animales pielágicos, blandos, transparentes y no contráctiles. Su tratamiento general consiste en el ácido crómico empleado lentamente, y con él pueden prepararse las especies siguientes:

Cleodora cuspidata.

Clionopsis Krohonii.

Cereseis acicula.

Hyalaea tridentata.

» *complanata*.

Pneumodermon mediterraneum.

Para la *Cymbulia Peronii* y la *Tiedermannia neapolitana* es mejor usar el ácido cromo-ósmico.

Cefalópodos.—Todos los animales de esta clase presentan los mismos caracteres para nuestro objeto. Para matarlos, el ácido picro-sulfúrico ó el crómico deberá emplearse siempre que se quieran hacer estudios histológicos ó morfológicos. Si sólo se desea preparar ejemplares para museos, puede servir el alcohol ácido. Los inconvenientes que en su lugar quedan expuestos, sobre el empleo del alcohol como líquido de matar, se hacen muy notables en las especies grandes de Cefalópodos, tales como el *Octo-*

pus vulgaris, por ejemplo. El alcohol no puede penetrar hasta el centro de los brazos, y su tejido entra pronto en maceración.

La rádula se prepara como la de los Gastrópodos.

Moluscóideos.

Comprende este Tipo los Briozoarios y los Braquiópodos. Los primeros pueden matarse por el método del alcohol lentamente, y quedan con los tentáculos fuera del cuerpo; y los segundos, ó bien de esta misma manera, ó simplemente con alcohol, del modo ordinario.

Tunicados.

Las Ascidias, ya sean simples ó compuestas, se matan con el ácido crómico lentamente. El Dr. Julin, de la Universidad de Lieja, que trabajaba en la Estación sobre esta Clase de animales, durante mi permanencia en ella, se servía del ácido picrosulfúrico, lo mismo rápida, que lentamente; pues si bien quita algo la transparencia, no importa cuando los ejemplares se destinan para seccionar; y si eran para conservarlos enteros, para museos, empleaba el ácido ósmico—á 1 por 100—vertiendo una pequeña cantidad en el agua de mar en que estaba el animal. Mr. Lo Bianco, para las Salpas en general, y sobre todo para las especies grandes, tales como la *Salpa Tilesi* y *maxima-africana*, usa el ácido cro-

mo-ósmico. Las especies pequeñas, como son la *S. fusiformis-runcinata* y *mucronata-democratica*, pueden obtenerse muy transparentes por medio de una mezcla de ácido crómico y acético (acético $\frac{1}{8}$); pero no sirve para las grandes, porque el ácido acético ablanda demasiado los tejidos. Yo he preparado estas dos especies con el ácido picro-sulfúrico, y quedan perfectamente, lo mismo que con el sublimado.

Para las especies de *Pyrosomá* lo mejor es el alcohol clorhídrico.

Vertebrados.

No continuaré examinando los animales de este Tipo, y señalando los mejores medios de matarlos y prepararlos, pues no le hará falta guía alguna al que haya leído los procedimientos generales con detenimiento. El ácido picro-sulfúrico es de un uso muy general, y convendrá perfectamente en la mayoría de los casos, ya en estados adultos como embrionarios. Para estos últimos el ácido ósmico da también muy buenos resultados. Yo me he servido de él para preparar embriones de Salmónidos y pequeñas truchas antes de reabsorber la vesícula ambilical, con muy buenos resultados, cosa que jamás pude obtener con los líquidos conservadores del Dr. Pacini. Para los embriones de peces grandes puede también usarse el sublimado.

B.—DISECCIÓN.

Sólo por no interrumpir la série completa de operaciones que hay que efectuar con un ejemplar, pongo aquí la *disección*, pues en la Estación Zoológica se efectúa esta, cuando hay necesidad, según el modo ordinario que está descrito en los libros que tratan especialmente de este asunto. En la parte que antecede, relativa á los procedimientos de matar y conservar, queda dicho lo suficiente para preparar los ejemplares para la disección; y como regla general puede decirse que será lo más conveniente, con aquellos animales que no se les haya señalado un tratamiento particular, matarlos con el ácido picrosulfúrico, y pasarlos luégo al alcohol, en donde se disecan. Si conviene endurecerlos, puede mezclarse el ácido picro-sulfúrico con el crómico; y para ponerlos transparentes, el Dr. Mayer recomienda la creosota, que tal vez podría sustituirse con ventaja por una disolución concentrada de ácido fénico. El hidrato de cloral presta también buenos servicios en algunas ocasiones.

C.—PROCEDIMIENTOS PARA COLORAR.

Muy raras veces se observan las secciones sin colorarlas de un modo conveniente; y para ello se pueden seguir dos caminos diferentes, que consisten en teñir, corte á corte, después de seccionado el ejemplar, ó bien colorarle *in toto*, y después sec-

cionarle. Este último método es el que se emplea en la Estación de Nápoles *siempre que sea posible*, pues es más rápido y más á propósito para los estudios morfológicos, puesto que permite con gran facilidad disponer un órgano, ó animal entero, en una *série de secciones*, de la manera que se dirá en el capítulo siguiente. Los histologistas se suelen más bien servir del primer método, porque su fin principal, al estudiar un corte, no es sólo ver en él las distintas regiones y tejidos bien diferenciados, para poder estudiar su posición relativa, sino la composición y propiedades de los tejidos mismos; y para ello les es preciso observar la acción de las sustancias colorantes, que usan más bien como reactivos.

Para colorar *in toto* animales ú órganos—á diferencia de las secciones, que es cosa de algunos minutos nada más—se necesitan de ordinario muchas horas y aún días; y de aquí que deban emplearse soluciones alcohólicas, pues en las acuosas los objetos entrarían en maceración, y aún podrían llegar á descomponerse. Otra razón hay para emplear en las coloraciones *in toto* soluciones alcohólicas, y es que se necesita que el líquido penetre perfectamente el cuerpo del ejemplar, condición que se llena más fácilmente cuanto mayor es la fuerza del alcohol; pero hay que tener en cuenta, según las observaciones del Dr. Mayer, que cuanto mayor es el tanto por 100 del alcohol en la solución colorante, más difusamente colora, como si el alcohol quitase á los tejidos su propiedad selectiva; y además también, tratándose del carmín, cochinilla y hematoxilina,

que cuanto más alcohólicas son las soluciones, menor cantidad de sustancia colorante contienen, y por lo tanto, menor será también su poder de coloración. De aquí la necesidad de poner en equilibrio estas tres condiciones, de modo que el objeto principal se llene sin perjuicio de las demás; y esto es lo que se ha tratado de hacer en las fórmulas de Mayer, Kleinenberg y Grenacher, que luégo consignaré. Algunas veces, como ha encontrado el Dr. Mayer, cuando los objetos son difícilmente penetrables, ó están protegidos por una cubierta *chitínosa*, en lugar de aumentar el tanto por 100 del alcohol en la solución colorante, se obtiene el mismo y aún mejor resultado, haciéndola obrar en caliente. (40° ó 50° C.)

Otra causa hace también que sea raro el uso de las soluciones acuosas en la Estación, aún cuando no se emplee la coloración *in toto*, y es que, como se ha visto en los «Procedimientos para matar, fijar y conservar,» los ejemplares están en alcohol de 70, y por tanto las secciones, al pasar á un líquido acuoso, por efecto de la fuerte osmósis que tiene lugar, se desgarran y se hinchan, hinchazón que no desaparece por un nuevo tratamiento por el alcohol; aunque no siempre, como hace notar el Dr. Mayer, es eso un inconveniente para la observación. Además, como en la Estación las preparaciones se montan casi exclusivamente en bálsamo de Canadá, después de colorar las secciones con una solución acuosa, es preciso hacerlas sufrir un tratamiento alcohólico con objeto de deshidratarlas, lo que produce pérdida de tiempo.

A pesar de todos esos inconvenientes, hijos más bien del exclusivismo en el método, que de la cosa en sí misma, las soluciones acuosas son indispensables en muchos casos, y en la misma Estación se usan algunas, tales como el picro-carminato; y muchos de sus inconvenientes desaparecen cuando se coloran las secciones una á una, y se montan en glicerina ó gelatina glicérica.

Una de las propiedades que ha de tener toda solución colorante, para ser buena, es gran poder de *diferenciación*: esto es, que tiña los distintos tejidos de una misma sección con diferente intensidad y tono de color, ó que no produzca la coloración *difusa*, como se dice en caso contrario. Esa propiedad selectiva ó de diferenciación que tienen los colores de fijarse de distinta manera en los diversos tejidos, ó bien de éstos de asimilarse diferentemente el color, se modifica mucho según el modo de operar. Ya he dicho cómo influye en ella la cantidad de alcohol, según las observaciones del Dr. Mayer. Otra condición que se debe tener presente es la de mayor ó menor cantidad de color. Una solución concentrada, y otra diluida, producen el mismo efecto, obrando diferente tiempo, pero la diferenciación será distinta. De ordinario será ménos difusa en la diluída; y deberá preferirse, á no ser que se siga un procedimiento inverso, que se usa mucho en la Estación, y que consiste en colorar por exceso, produciendo de esa manera una coloración difusa, y luégo decolorar por medio del lavado con un líquido conveniente—alcohol ó alcohol ácido—hasta obte-

ner la intensidad conveniente. Este método da muy buenos resultados en las coloraciones *in toto*.

Innumerables son las sustancias, que en distintas fórmulas y combinaciones, se usan en microscopia con objeto de diferenciar bien los tejidos y sus elementos. Los histólogos, sobre todo, son los que cada día aumentan su número, pues se sirven de ellas como de reactivos para estudiar los elementos histológicos y sus mútuas relaciones; pero en los trabajos morfológicos su importancia es más limitada, y por eso sólo me ocuparé de las siguientes fórmulas, de principal interés y de constantes resultados (1).

Las sustancias colorantes me parece podrían dividirse en estas cuatro secciones, agrupando las de propiedades semejantes:

- 1.^a Carmín, cochinilla, hematoxilina, etc., etc.
- 2.^a Colores de anilina.

Estas sustancias se fijan en los tejidos sin alteración química.

3.^a Ácido ósmico y demás que se combinan con las diversas sustancias de las celdillas.

4.^a Cloruro de oro, nitrato de plata etc., que no se combinan con las sustancias celulares, pero sí se fijan en ellas, descomponiéndose por reducción.

(1) El lector que desee conocer la historia detallada del empleo de las sustancias colorantes en microscopia, puede ver el trabajo completo, bajo el punto de vista histórico-bibliográfico, del Prof. H. Gierke—publicado después de presentada esta Memoria—titulado: «Färberei zu mikroskopischen Zwecken.» (*Zeitschrift f. wiss. Mikros.* tomo I (1884), part. 1.^a, 3.^a y 4.^a)

Las sustancias de las dos últimas secciones son más propias para trabajos histológicos, y no se emplean en la Estación, razón por la cual tampoco me ocuparé de ellas; pues aunque se hace mucho uso del ácido ósmico, es como agente de matar y fijar, y se procura siempre, por todos los medios posibles, que no produzca efectos colorantes. Los colores de anilina tienen bastantes desventajas, y no sirven para colorar *in toto*; y, á pesar de tener el gran atractivo de la novedad, no se usan en Nápoles, á excepción de dos ó tres (pardo de Bismarck, safranina, etc.); pero los colores que verdaderamente pueden llamarse de la Estación, son el carmín, la cochinilla y la hematoxilina, sobre todo en sus fórmulas alcohólicas; pues tienen la ventaja de colorar *in toto*, diferenciar bien, ser completamente estables y dar resultados constantes, que es lo que se necesita para los estudios morfológicos.

Carmin.

El carmín es uno de los primeros colores que han empleado los histologistas, y aún hoy día su uso es muy general. No es soluble en el agua, y muy poco en el alcohol, y de aquí que deba siempre emplearse con otra sustancia que le sirva de disolvente. Al principio fué esta el amoniaco y luégo el ácido acético ó clorhídrico, el borax, el alumbre, etc. etc., dando lugar á una multitud de fórmulas, de las que, las más importantes, se pueden agrupar de la siguiente manera:

Como disolvente el amoniaco.—Carminato de amónio ó carmín amoniacal. (Fórmulas: Hartig, Prof. Exner, Dr. Beale, Prof. Hoyer).

Como disolvente un ácido.—Carmín acético de Schneider.

Carmín clorhídrico (Exner).

Carmín alcohólico de Grenacher y Mayer.

Como disolvente el alumbre.—Carmín-alumbre de Grenacher.

Como disolvente el borax.—Carmín borácico-alcohólico de Grenacher.

Carmín borácico-ácido de Grenacher.

Como disolvente el oxalato amónico.—Carmín oxálico de Thiersch.

Si á esta lista se añade la mezcla del carminato amónico con el ácido pícrico, que forma el picro-carminato amónico, estarán representadas las diversas formas bajo las cuales se emplea comunmente el carmín. Tal vez un examen razonado y comparativo haría desaparecer alguna de ellas, por dar idénticos resultados que el de otras, más ese examen no sé que se haya hecho aún.

En la Estación de Nápoles se usa muchísimo el carmín borácico-alcohólico, para colorar *in toto*, y el picro-carminato amónico; y en algunos casos solamente las otras soluciones de carmín de Grenacher. A pesar de eso, indicaré sus fórmulas por lo que puedan convenir, pues en muchos casos será preciso usar una tintura neutra, ácida ó básica, acuosa ó alcohólica, y ninguno de los colores que

hoy se emplean se presta tanto como el carmín á esas diferentes combinaciones.

El carmín se fija principalmente en las sustancias protoplásmicas, y sobre todo en los núcleos; y cuando por medio de un líquido decolorante se lavan las secciones, son siempre estos últimos los que se resisten más á perder el color. La propiedad selectiva de los diversos tejidos para tomar más ó ménos carmín es bien marcada, y usándolo de un modo conveniente se obtienen coloraciones perfectamente diferenciadas. El carmín ácido es el que diferencia ménos. Otra ventaja grande del carmín es su gran estabilidad, ya se monten los cortes en glicerina ú otros líquidos acuosos, ó bien en bálsamo de Canadá.

El carmín se emplea en la doble coloración con los derivados de la anilina, pero difícilmente se obtienen mejores resultados que con el picro-carminato, al que casi no pueden ponerse otros inconvenientes que la necesidad de usarlo siempre en solución acuosa.

1. *Carmin amoniacal*.—El amoniaco es muy buen disolvente del carmín, formándose un carminato de amónio; pero al mismo tiempo, en estado libre, ataca fuertemente los tejidos animales. Transforma las sustancias albuminóideas en albuminatos alcalinos (Exner), que son solubles en un exceso de amoniaco, sucediendo muchas veces, si el carmín es alcalino, que disuelve enteramente las secciones; y tratándose de objetos muy delicados, basta para eso que sea pequeñísima la cantidad de álcali libre. A mí me ocurrió, al hacer unas preparaciones de

los glóbulos nucleados de la sangre del *Triton marmoratus*, emplear para la doble coloración un carmín que tenía por completamente neutro, y á los tres ó cuatro días, después de haber cerrado las celdillas, encontré que la membrana (?) de los glóbulos había sido completamente disuelta, y la preparación se había convertido en una sustancia granujienta, formada casi exclusivamente por los núcleos. Por eso es preciso, al preparar el carmín amoniacoal, tener mucho cuidado de que en la solución haya sólo la cantidad exclusivamente necesaria para disolver el carmín, combinado con él en forma de carminato.

No describiré los distintos medios que se han propuesto para preparar el carmín, encaminados todos ellos á obtener la solución completamente exenta de álcali libre, y sí sólo el procedimiento que el Profesor H. Hoyer ha dado á conocer recientemente.

Disuélvase un gramo de carmín en una mezcla de 1—2 centímetros cúbicos de fuerte solución de amoniaco, y 6—8 centímetros cúbicos de agua; y póngase en un baño de arena hasta que todo el amoniaco libre se haya evaporado. Esto se conoce teniendo en cuenta que mientras haya amoniaco libre se desprenderán *burbujas grandes*, y el color de la solución será rojo cereza algo morado; y que cuando el amoniaco libre se haya evaporado del todo, las *burbujas serán pequeñas*—proviniedo de la descomposición del carminato—y al mismo tiempo se formará un precipitado de color rojo de fuego. Cuando esto ocurra se dejará enfriar, y luego se fil-

tra. El precipitado es de carmín, que puede emplearse para cualquier otro uso. La solución queda de esta manera en estado de servir; y con el fin de que no se altere con el transcurso del tiempo, se le añade el 1 ó 2 por 100 de hidrato de cloral. Si se deseara una solución alcohólica, puede mezclarse con 4—6 veces su volumen de alcohol, teniendo en cuenta que, cuanto más fuerte sea éste, ménos carmín contendrá. El precipitado que en este caso se forma es de carminato de amónio, soluble en el agua.

La fórmula del Dr. Beale no viene á ser otra cosa que el carmín amoniacal mezclado con glicerina, y es más útil á los histólogos que para los trabajos de morfología. El modo de prepararlo se encuentra en casi todos los tratados de histología, y por eso excuso ponerlo aquí.

2. *Carmín acético.*—Se disuelve toda la cantidad que se pueda de carmín en ácido acético hirviendo (de 45 por 100), se filtra luégo, y se diluye al 1 por 100 para el uso (Schneider).

El carmín acético diferencia ménos bien que las otras fórmulas.

3. *Carmín alcohólico.*—El Dr. P. Mayer ha modificado la fórmula de Grenacher, con objeto de que sirva para colorar también las secciones dispuestas en serie, por el procedimiento de la albúmina, que se describirá más adelante. Cuatro gramos de carmín se disuelven, al baño de maría, durante media hora, en 100 centímetros cúbicos de alcohol de 80 por 100, al que se hayan añadido 30 gotas de ácido clorhídrico concentrado. La solución

se filtra en caliente, y se neutraliza con algunas gotas de amoniaco, hasta que empiece el carmín á depositarse.

Esta solución tiñe rápidamente y con intensidad, pero de un modo difuso; y para que produzca buena diferenciación, es preciso decolorar luégo con alcohol ácido.

4. *Carmín alumbre de Grenacher.*—A una solución acuosa de alumbre común ó amoniaco de 1—5 por 100 (también puede llegarse á la saturación) se añade el $\frac{1}{2}$ á 1 por 100 (cantidad *ad libitum* según Tangl) de carmín pulverizado, y se hace hervir durante 15 ó 20 minutos. Luégo se filtra; y para conservarla es bueno poner un poco de hidrato de cloral, tymol ó ácido fénico.

Después de teñidas las secciones, deben lavarse con agua.

El carmín-alumbre es una de las soluciones que tienen más selección por los núcleos; y en su uso no hay que temer la coloración por exceso, aunque se dejen las secciones en el líquido colorante por un día entero ó más. Por lo general, bastarán 5 ó 10 minutos para que tomen un hermoso rojo, tirando algo á púrpura, y queden los tejidos bien diferenciados. Puede también usarse la solución diluída.

5. *Carmín borácico-alcohólico.*—A una solución acuosa de borax al 4 por 100 se le añade toda la cantidad de carmín que pueda disolver en caliente. Luégo se mezcla esta solución con un volumen igual de alcohol de 70 por 100, y después de dejarla reposar por 24 horas se filtra (Grenacher).

En la Estación se usa mucho el carmín borácico para colorar *in toto*. El tiempo que debe estar el objeto es variable, según su tamaño y naturaleza, desde tres ó cuatro horas á 24 ó más. Los animales revestidos de una cubierta *chitínosa* se dejan á veces penetrar difícilmente, y este inconveniente puede remediarse por medio del calor, manteniendo el líquido á una temperatura de 40° á 50° C. mientras dura su acción. Casi siempre convendrá colorar un poco por exceso, y después lavar con alcohol de 35 por 100, al que se haya añadido una pequeña cantidad de ácido clorhídrico (3—4 gotas por cada 100 centímetros cúbicos); y cuando se haya obtenido el grado de coloración conveniente se cambia el alcohol por otro más fuerte, y así gradualmente hasta llegar al endurecimiento necesario.

El Dr. Mayer prepara esta solución de carmín de modo que resulte con el 50, 60 y 70 por 100 de alcohol. Esta última contiene muy poco carmín, pero conviene para aquellos objetos delicados que podrían experimentar deterioro introduciéndolos en una solución muy acuosa. El alcohol hirviendo de 50 á 60 por 100, disuelve el 1 por 100 de carmín, é igual cantidad de borax. Inútil es decir que los lavados deben hacerse con alcohol del mismo grado que la solución.

6. *Carmín borácico-ácido de Grenacher*.—Una solución acuosa de borax al 1—2 por 100, y $\frac{1}{2}$ — $\frac{3}{4}$ por 100 de carmín, se calienta hasta que éste se haya disuelto del todo, y luégo se añade ácido acético, gota á gota, hasta que tome un color rojo vivo.

Se deja reposar 24 horas, y se filtra ó se decanta.

Esta solución no debe emplearse para colorar *in toto*. Las secciones en $\frac{1}{3}$ —3 minutos habrán tomado color, pero difusamente; más un lavado con alcohol de 50 á 70 por 100, al cual se hayan añadido unas gotas de ácido clorhídrico (3—4 por 100 centímetros cúbicos) las decolorará, excepto los núcleos, que aparecerán de esta manera bien de manifiesto.

7. *Carmin oxálico de Thiersch.*—*a.)* Se disuelve una parte en peso de carmín, en una parte de amoniaco y tres de agua.

b.) Se disuelve una parte de ácido oxálico en 22 de agua.

c.) Un volumen del líquido *b)* se mezcla con 12 de alcohol absoluto.

d.) Un volumen del líquido *a)* se mezcla con ocho del líquido *c)* y se filtra.

La solución debe tomar el color anaranjado por la adición de algunas gotas de ácido oxálico, y volverse violeta por el amoniaco.

8. *Picro-carminato de amonio.*—Ranvier introdujo en la histología animal este reactivo, que tiene también su empleo en la vegetal; y sus resultados son tan excelentes, que es hoy día una de las sustancias colorantes más usadas. Sus efectos están fundados en las opuestas propiedades del carmín y del ácido pícrico, teniendo el uno gran selección por los núcleos y materia protoplásmica, mientras que el otro se fija de preferencia en las paredes de las celdillas, fibras etc., y de aquí sus efectos de doble coloración.

Ranvier no dió la fórmula precisa del picro-carminato, limitándose á indicar las siguientes direcciones para prepararlo. A una solución amoniacal de carmín, añádase una solución concentrada de ácido pírico hasta la saturación, y luégo evapórese en una estufa hasta que el líquido quede reducido á $\frac{1}{5}$ parte; fíltrese y evapórese de nuevo hasta la sequedad. Para el uso, disuélvase una parte en peso del residuo seco, en 100 de agua.

El punto de saturación del carmín por el ácido pírico es bastante indeterminado, y la preparación larga y complicada, por lo que la mayor parte de micrógrafos compran el picro-carmin preparado ya; pero como el que se vende raras veces reúne todas las condiciones necesarias, conviene preparárselo uno mismo. El procedimiento del Dr. Mayer, que es el más sencillo que conozco, y el que se usa en la Estación, es el siguiente:

a.) Se prepara una solución de carminato de amonio, mezclando dos gramos de carmín en polvo con 25 centímetros cúbicos de agua y el amoniaco necesario para que el carmín se disuelva. Con objeto de que se desprenda todo el amoniaco libre, el Doctor Mayer deja la solución en un vaso abierto, de boca ancha, por espacio de algunas semanas; pero también puede emplearse, y lo creo preferible, el procedimiento del profesor Hoyer, descrito al tratar del carmín amoniacal.

b.) Un volumen de la solución *a)* se mezcla con cuatro de una disolución concentrada de ácido pírico; y para que el líquido no sufra alteración, se

ponen en el frasco unos cuantos cristales de tymol ó unas gotas de hidrato de cloral (1 por 100). La adición del ácido pícrico debe cesar desde el momento que se forme un precipitado.

Según el profesor Hoyer se obtiene también muy buen picro-carmín, mezclando el carminato de amonio que se forma al preparar el carmín amoniacal alcohólico, con una disolución concentrada de ácido pícrico.

El procedimiento del Dr. Mayer, que acabo de describir, difiere de todos los demás en los que se trata de seguir estrictamente las indicaciones de Ranvier, y tiene en su favor la mayor sencillez; y sus resultados están garantidos por el largo tiempo que se usa en la Estación. En el Laboratorio anatómico de la Universidad de Cornell (Estados-Unidos de América) se han hecho varias y minuciosas experiencias para determinar el mejor modo de preparar el picro-carminato, siguiendo las indicaciones de Mr. Ranvier, y los resultados obtenidos, según los expone Mr. Gage en el *American monthly microscopical Journal* (año 1880), son los siguientes:

1. Partes iguales, en peso, de ácido pícrico y carmín, dan los mejores resultados.
2. El ácido pícrico debe disolverse en cien veces su peso de agua, usando el calor si es necesario.
3. El carmín debe disolverse en cinco veces su peso de fuerte disolución amoniacal.
4. Mézclense las dos soluciones. Parece indiferente verter la una en la otra ó *vice-versa*.

5. Empléense evaporadores de porcelana y embudos de cristal.

Los mejores resultados se obtuvieron cuando las soluciones fueron hechas á la temperatura ordinaria del laboratorio—17° C.—y luégo evaporadas las tres cuartas partes á la temperatura de 40°—45° C. Después de fría la solución debe filtrarse con un filtro doble. El líquido filtrado se evaporará hasta la sequedad á 40° C., ó á la temperatura ordinaria. Si la preparación ha sido bien hecha, una parte en peso se disolverá en 100 de agua, quedando un líquido transparente después de filtrado.

Luégo propone Mr. Gage la siguiente mezela:

Picro-carmín.....	100	centímetros	cúbicos.
Glicerina.....	25	»	»
Alcohol de 95 por 100.....	10	»	»

que se conserva indefinidamente, con sólo filtrarla cada cinco ó seis meses.

Otras fórmulas para preparar el picro-carmín han sido dadas por Rutherford (*Practical Histology*), el Dr. Weigert (*Arch. path. Anat.*, LXXXIV, 1881), y el Dr. Frank (*Am. Month. Micr.*, v, 1884). (1)

Los objetos, después de teñidos con el picro-carmín, deben lavarse bien con agua, teniendo presente, para regular el tono de color, que el carmín no es soluble, sobre todo el fijado por los núcleos, y

(1) En la *Biologie Cellulaire* de Mr. Carnoy, he visto descrito otro procedimiento para preparar el picro-carmín, que es el que se usa en el laboratorio de la Universidad de Lovaina (página 92, nota 4.^a)

el ácido pícrico sí, aunque en pequeña cantidad.

El picro-carmín no es muy á propósito para colorar *in toto*, y por esta razón su uso no es tan general en la Estación como el del carmín borácico, pero, á pesar de eso, da en algunos casos excelentes resultados, y el Dr. Lang lo emplea de preferencia para colorar las Planarias.

Cochinilla.

La cochinilla se usa comunmente por los histólogos en solución acuosa, según las fórmulas de Czokor y Klein; y para evitar sus inconvenientes, el Dr. Mayer ha propuesto la tintura, que es la única que se emplea en la Estación.

1. *Tintura de cochinilla del Dr. Mayer.*—Un gramo de cochinilla pulverizada se pone en digestión, por espacio de varios días, en 8—10 centímetros cúbicos de alcohol de 70 por 100, y luégo se filtra. Cuanto más diluido esté el alcohol, tanto mayor será la intensidad de la tintura; pero en cambio su poder de penetración—cosa muy importante cuando se quiere colorar *in toto*—será menor, y por lo tanto debe atenderse á estas dos propiedades opuestas. El Dr. Mayer cree que quedan lo suficiente equilibradas con el alcohol de 70 por 100.

Tiene aplicación esta tintura en todos aquellos casos que no convenga emplear una solución acuosa, y tiene la ventaja sobre las alcohólicas de carmín (carmín borácico, carmín alcohólico etc.) que por lo general tiñe bien los objetos que hayan sido tra-

tados por el ácido crómico—nó por el ósmico—pero en cambio sus efectos no son tan constantes. El color que comunica á los tejidos cambia según su naturaleza, la de las sales que tengan en suspensión y el tratamiento anterior á que hayan sido sometidos. Los ácidos le comunican un color amarillo, mientras que los álcalis la hacen pasar á púrpura; pero el cambio más notable lo experimenta con las sales solubles en alcohol, que originan un precipitado azul ceniciento, verde ceniciento ó azul negruzco. Por eso muchas veces los tejidos presentan estos colores, pues es sabido que por más cuidado que se ponga, nunca se llega á desembarazarles de las sales que tienen en estado vivo. Estas coloraciones sólo se presentan en ausencia de los ácidos y en presencia de las sales. En los demás casos, el color es siempre rojo; pero según el mismo doctor Mayer dice, es imposible saber el color que en definitivo un determinado tejido tomará, pues ocurre que en un mismo objeto presentan, con la misma tintura, dos diferentes colores.

Otra cosa particular pasa con la cochinilla, y es que según el tanto por 100 del alcohol que se emplee, se disuelven tales ó cuales principios que son insolubles en un alcohol de distinto grado; y por eso siempre que se añada á la tintura alcohol que no sea enteramente igual al que sirvió para hacerla, se forma un precipitado. Esta circunstancia hay que tenerla muy presente al lavar los objetos después de teñidos, sobre todo si se quisiera hacer bajar el tono del color; pues si se emplea alcohol de diferente

grado, en lugar de disolver los distintos principios de la cochinilla, servirá para fijarlos más.

Para teñir los objetos con la cochinilla deberán lavarse bien ántes con alcohol de 70, y si se sospechase que el alcohol pudiese haber determinado la formación de una costra de sales, según se ha dicho al tratar de esta sustancia como líquido de matar, se empleará el alcohol ácido, procurando luégo quitar hasta las últimas trazas de ácido por medio de lavados con alcohol.

La tintura debe usarse en abundancia, y es muy variable el tiempo necesario para que produzca una buena coloración, no habiendo inconveniente en prolongarlo por algunos días con los objetos grandes, aunque en este caso es preferible emplear la hematoxilina, que colora más intensamente, ó bien el borax-carmin. Colorados ya los objetos se lavan con alcohol de 70, y si hubiese exceso de coloración, se le añadirá el $\frac{1}{10}$ por 100 de ácido clorhídrico, ó el 1 por 100 de acético.

2. *Solución de cochinilla de Czokor.*—(Las fórmulas de Czokor y Klein vienen á ser iguales, por lo ménos tal como se encuentran en el «Journal of the Royal Microscopical Society» correspondiente á los años 1881 y 1882; pero la de Czokor ha sido publicada un año ántes.)

Se disuelve el 1 por 100 de alumbre calcinado, é igual cantidad de cochinilla, en agua destilada, y luégo se hace hervir hasta que quede reducido á los cuatro séptimos. Filtrese, y añádanse unas gotas de ácido fénico.

Hematoxilina.

La hematoxilina y la hematina son los dos principios colorantes del palo campeche, pero sólo el primero se usa en microscopia. La coloración azulada ó violeta que produce, es más agradable que la del carmín, pero sus resultados no son tan fijos. Puede emplearse en solución acuosa ó alcohólica, y esta última, según la fórmula de Kleinenberg, es la única que tiene uso en la Estación.

1. *Hematoxilina de Kleinenberg.*—*a.)* A una solución saturada de cloruro de calcio en alcohol de 70 por 100, se añade alumbre hasta la saturación y se filtra.

b.) Un volúmen del líquido *a)* se mezcla con 6—8 volúmenes de alcohol de 70 por 100.

c.) Al tiempo de usarse se vierte en el líquido *b)* algunas gotas de una tintura concentrada de hematoxilina en alcohol absoluto, hasta que tome la intensidad de color que se desee.

Una buena solución debe presentar un color de violeta tirando algo al azulado. Si después de algún tiempo de preparada se pusiera ligeramente roja, indica que contiene ácido libre, y no debe usarse. Para evitar que eso suceda conviene no preparar más que la cantidad que se vaya á usar; pero en caso de necesidad puede remediarse destapando el frasco, y poniéndolo debajo de una campana de cristal junto con otro de amoniaco. Entonces el amoniaco se apodera del ácido libre; pero debe te-

nerse en cuenta que si se prolonga demasiado su acción, se formará un precipitado, en cuyo caso debe desecharse.

El cloruro de calcio que entra en la composición de esta fórmula, no tiene más objeto que aumentar la acción osmótica entre el líquido colorante, y el alcohol que contienen los tejidos del objeto; pero como al poner el alumbre en la solución *a)* se forma un precipitado de sulfato de calcio, para evitarlo propone Mr. Whitman sustituirlo por el cloruro de aluminio.

La hematoxilina tiñe rápidamente y con intensidad, y da muy buenos resultados para colorar *in toto*. Puede usarse diluída con el líquido *a)* cuando los objetos son pequeños, y produce una coloración muy diferenciada. Antes de teñir los objetos, es preciso lavarlos bien con alcohol de 70, para que no contengan nada de ácido, pues según las experiencias del Dr. Mayer, es lo que produce el color amarillo ó amarillo parduzco que á veces toman las secciones, y que ha hecho decir que la acción de la hematoxilina no era constante. Según el Dr. Cook, el mismo efecto producen los cromatos alcalinos. Después de teñidos los objetos ó secciones se lavan con alcohol de 70—90 por 100; y si se hubiese producido una coloración por exceso, lo mismo que en los casos anteriores, podrá servirse del alcohol ácido ($\frac{4}{3}$ por 100 de ácido oxálico ó clorhídrico) suspendiendo su acción enseguida que se note que el color enrojece, y pasándolo al alcohol ordinario en donde volverá á tomar el azul violeta.

2. *Solución acuosa de hematoxilina.*—*a.)* En 10 centímetros cúbicos de agua se disuelven 35 centigramos de hematoxilina.

b.) Se disuelven tres gramos de alumbre en 30 centímetros cúbicos de agua.

c.) A la solución *a)* se le añaden algunas gotas de la solución *b)*.

Esta solución debe tener un bonito color de violeta, y es una de las que mejor diferencia los núcleos.

Colores de anilina.

En la Estación de Nápoles tienen un uso muy limitado, y el Dr. Mayer no es partidario de ellos. Efectivamente, presentan inconvenientes reales, como son por ejemplo, su poca estabilidad—excepto el pardo de Bismarck—el no ser á propósito para colorar *in toto*, y dar resultados muy inconstantes, de modo que sus efectos no se pueden predecir con la seguridad que se hace tratándose del carmín ó de la hematoxilina, pero así y todo, no creo sean bastantes inconvenientes para abandonarlos por completo.

El moderno estudio de las Bacterias mucho ha contribuído á poner en moda estos colores, y basta para convencerse de ello hojear algunos números de cualquiera de las publicaciones periódicas de Microscopia; y también se verá la poca constancia en sus efectos, y las opiniones contradictorias sobre sus propiedades.

El empleo de los colores de anilina es sumamente sencillo. Unos son solubles en agua, y otros en alcohol. Basta, pues, hacer una solución de intensidad conveniente según se quiera colorar lenta ó rápidamente, y luego lavar la sección con agua ó alcohol, teniendo en cuenta que el color no queda fijado, sino que va disolviéndose á medida que el lavado se prolonga, hasta decolorarse por completo en algunos casos. Por eso es muy importante detener el lavado en un punto conveniente, y tratar enseguida el corte por la esencia de clavo y el bálsamo del Canadá. Según Giesbach el verde de yodo (verde Hoffmann) es uno de los colores que más se fijan en los tejidos, y mejor resisten el lavado alcohólico.

Como es muy útil, para servirse de los colores de anilina, conocer su mayor ó menor solubilidad en el agua ó alcohol, á continuación la indico de los principales colores, según el Dr. Harris. (Quart. Jour. Micr. Sci., xxiii, 1883.)

Color pardo.—Bismarck—parcialmente soluble en agua; soluble en alcohol débil.

Vesubina—soluble en agua.

Chrisoidina—soluble en agua.

Color rojo.—Eosina—muy soluble en agua.

Anilina escarlata—insoluble en agua; soluble en alcohol.

Flamingo (rojo pardo oscuro)—en parte soluble en agua; fácilmente soluble en alcohol.

Ponzó (rojo carmesí oscuro)—en parte soluble en agua; fácilmente soluble en alcohol diluído.

(Este color es una mezcla de rosanilina y fosfina.)

Rosanilina—parcialmente soluble en agua; fácilmente soluble en alcohol diluido.

Fuchsina—parcialmente soluble en agua; soluble en alcohol diluido.

Color anaranjado.—Aurina.—insoluble en agua; parcialmente en alcohol fuerte, y algo más en alcohol absoluto.

Anilina anaranjada—insoluble en agua; parcialmente en alcohol fuerte, y algo más en alcohol absoluto.

Tropæolina—parcialmente soluble en agua; más soluble en alcohol.

Fosfina (amarillo anaranjado)—parcialmente soluble en agua; más soluble, pero no del todo, en alcohol.

Safranina—soluble en agua y en alcohol.

Color amarillo.—Fluorecina (amarillo verdoso)—insoluble en agua; soluble en alcohol con un hermoso color fluorescente.

Anilina primavera (*Primula*)—sólo en parte soluble en alcohol.

Color verde.—Verde de yodo (verde Hoffmann, verde azulado)—soluble en agua y en alcohol.

Verde malaquita—soluble en agua y en alcohol.

Color azul.—Azul soluble de anilina—enteramente soluble en agua.

Azul de Lyon—insoluble en agua; soluble en alcohol fuerte.

Azul metilo (azul muy oscuro)—soluble en agua y en alcohol.

Azul China—soluble en agua y en alcohol.

Color violeta.—Violeta Hoffmann—soluble en agua y en alcohol.

Violeta metilo (Violeta de París)—parcialmente soluble en agua; soluble en alcohol.

Violeta de genciana—soluble en agua y alcohol.

Azul Tiria (muy próximo al violeta)—soluble en agua.

Púrpura de Spiller—soluble en alcohol.

En esta lista sólo figuran una pequeña cantidad de los colores que da la anilina, tan numerosos hoy, que reina gran confusión, lo mismo en el conocimiento de sus propiedades, que en su composición y nombre. Por eso, si nos atreviésemos á dar un consejo, diríamos que lo mejor y más seguro es procurarse unos cuantos colores, estudiarlos prácticamente bajo el punto de vista microquímico y no salirse de ellos. Así lo he hecho en cuanto se refieren á las secciones vegetales, y limitándome á cinco ó seis, logro usarlos con bastante seguridad.

Los colores de anilina pueden emplearse combinados para producir la doble y triple coloración. Para ello se siguen varios métodos, y uno de los más prácticos es el de Gibbes, que por lo ménos en los cortes vegetales, da casi siempre buenos resultados. Consiste en teñir primero la sección con una disolución alcohólica, y después de bien lavada, con una acuosa. El todo está en elegir bien los dos colores, para lo que servirá la lista que acabo de

poner. Por ejemplo: para la solución alcohólica puede emplearse la rosanilina ó el violeta de metilo, parcialmente solubles en agua, y para la acuosa el azul soluble ó el verde de yodo. De esta manera, los tejidos que no hayan tenido gran selección por el color alcohólico podrán tomar el acuoso, y efecto de sus distintas solubilidades, en lugar de perjudicarse, contribuirán á fijarse más el uno al otro. El Dr. Stirling propone, con objeto de fijar bien el color alcohólico, lavar las secciones, ántes de introducir las en la solución acuosa, con agua acidulada con ácido acético ó clorhídrico. (1 por 100).

Para obtener una doble ó triple coloración, se ha propuesto: por el Dr. Stirling el uso simultáneo del picro-carmín y de varios colores de anilina, especialmente del verde de yodo; del picro-carmín, verde de yodo y verde de malaquita, por Mr. Richardson; del picro-carmín y la eosina, por el Dr. Lang; de la hematoxilina y la eosina, por Mr. Renant; del cloruro de oro y varios colores de anilina, por el Dr. Gibbes, etc., etc.; y en la literatura, al final de este capítulo, se indican las citas en donde podrán verse descritos esos procedimientos.

Otra propiedad que ha dado importancia á los colores de anilina es la selección de la mayor parte de ellos por los núcleos, selección que tienen también el carmín y la hematoxilina. El *modus operandi*, debido á Flemming, consiste en lo siguiente:

- a.) Se endurecen los objetos en ácido crómico.
- b.) Se lavan bien con agua.

c.) Se lavan con alcohol y se coloran enseguida. Al principio el color predilecto era la safranina, más luégo se ha visto que otros varios producen el mismo efecto. Flemming recomienda además, el rojo de Magdala y el violeta dahalia, preparados de esta manera:

Una parte de safranina, ú otro color, se disuelve en 100 de alcohol absoluto, y después de algunos días se mezcla con 200 partes de agua.

d.) Después de teñidos los cortes se lavan con alcohol de 70 por 100, y luégo con alcohol absoluto, hasta que la coloración haya desaparecido de todas partes, excepto de los núcleos, sirviéndose del microscopio para determinar ese punto.

La predilección de estos colores por los núcleos—excepto la eosina y algún otro—hace que se empleen con ventaja en el estudio de los Schizomicetos. Los colores más convenientes para los *Micrococcus*, según Weigert, son los siguientes:

Color rojo.—Todos los rojos, y especialmente la purpurina, fuchsina y el rojo de Magdala. (También los preparados de carmín).

Color amarillo.—Safranina.

Color verde.—Verde de metilo.

Color azul y violeta.—Verde de yodo, de metilo, dahalia y violeta de genciana. (También la hematoxilina).

Color pardo.—Pardo de Bismarck.

Para los *Bacillus*, ni la hematoxilina ni el carmín sirven, y ningún color da tan buenos resultados como el violeta de genciana.

Finalmente, y para terminar, indicaré las combinaciones que el Dr. Harris encuentra mejores para la doble coloración de los corpúsculos nucleados de la sangre, pues las mismas podrán servir para teñir las secciones; debiendo tenerse presente que sólo operando en idénticas condiciones se obtendrán iguales resultados, y aún así nunca con la seguridad que con el carmín y la hematoxilina.

Rosanilina y verde de anilina.

Fuchsina y azul de metilo.

Fuchsina y pardo Bismarck.

Eosina y vesubina.

Verde de yodo y pardo Bismarck.

Violeta Hoffmann y pardo Bismarck.

Violeta de anilina y azul de metilo.

Literatura referente á los procedimientos de coloración:

Dr. Mayer, *M. T. Zool. Stat. Neap.*, II (1880), p. 1-27.—Dr. Whitman, *Amer. Nat.*, XVI (1882), p. 772.—Prof. H. Hoyer, *Biol. Centralbl.*, II (1882), p. 17-19.—Prof. Exner, *Guide dans l'examen microscopie*, p. 45-46.—Schneider, *Zool. Anzeig.*, número 56.—Grenacher, *Arch. Mik. Anat.* XVI (1879), p. 463.—Prof. Gage, *Am. month. Micr. Jour.*, 1880, p. 22.—Rutherford, *Practic. Histology*.—Prof. C. Weigert, *Arch. path Anat.* (Virchow) LXXXIV (1881), p. 275.—J. Czokor, *Zool. Jahresbericht Neap.*, I (1880), p. 42.—Klein, *Mag. Nat. Hist.*, VIII (1881), p. 232.—Dr. Cook, *Jour. Anat. and Phys.*, XIV (1879), p. 140.—Dr. Harris,

Quart. Jour. Micr. Sci., xxii (1883), p. 292.—H. Gibbes, *Jour. Roy. Micr. Soc.*, III (1880), p. 291.—Dr. Stirling, *Jour. Anat. and Phys.*, xv (1881), p. 349.—Mr. Renant, *Comptes Rendus*, LXXXVIII (1879), p. 1.039.—Wills Richardson, *Jour. Roy. Micr. Society.*, 1881, p. 868.—Flemming, *Arch. f. Mik. Anat.*, XIX (1881).

D.—PROCEDIMIENTOS PARA SECCIONAR Y MONTAR LAS SECCIONES.

Después de muerto un animal, fijados sus tejidos, disecada la parte que se quiera examinar—caso de que no sea todo él—y teñido según los procedimientos y en las condiciones que quedan indicadas, viene ahora el hacer su examen microscópico; mas para ello es preciso ponerle en condiciones á propósito, pues, como ya he dicho, rarísimos son los casos en que un animal se puede observar directamente. Por regla general hay que cortarle en secciones planas muy delgadas, y examinar cada una de ellas; y no se crea que constituye ésto un inconveniente del examen microscópico, pues es el mismo método general que seguimos también en el macroscópico, siempre que queremos hacernos cargo de la verdadera forma de un objeto. No es pues solamente porque no hay otro medio de examen por lo que se reduce á secciones, sino porque es el único modo de conocer su estructura. Las Diatomeas, por ejemplo, se pueden examinar enteras, y, no obstante, hasta que se han obtenido secciones de algunas de ellas no se ha tenido el perfecto conoci-

miento de la disposición de sus valvas. Los Infusorios están en igual caso, y á pesar de eso, mucha utilidad reportaría también poderlos observar en secciones. Por regla general, se puede pues decir, que siempre que queramos conocer completamente la estructura de un objeto se debe seccionar, aunque por sus dimensiones no haga falta para el examen microscópico.

Un animal ó un órgano cortado en:

secciones planas de igual espesor,
paralelas,
colocadas en série,
y orientadas de la misma manera,

esto es, *microtomized* (microtomizado?) se encuentra en las mejores condiciones posibles para determinar su forma, y sus relaciones de estructura. Está en el mismo caso que un terreno del que hayamos levantado las curvas de nivel: podemos trazar perfiles en todas direcciones, y conocer la forma de sus distintas partes con la misma seguridad que si tuviésemos dibujadas sus dos proyecciones, ó conociésemos las acotaciones de todos sus puntos.

Este es el método que se sigue en la Estación Zoológica. Un órgano, ó un animal, se reduce á una *série* de secciones—200, 300, 500 ó más—dispuestas de la manera dicha, y luégo se estudian; y no entraré en detalles sobre el modo de *reconstruir* los objetos por medio de la observación de sus secciones, porque es esa una cuestión de microscopia general, y además no ofrecerá dificultad al que tenga unas ligeras nociones de geometría descriptiva. Esta

reconstrucción se facilitará mucho eligiendo de un modo conveniente el eje á que han de ser perpendiculares todas las secciones (1).

Para formar estas series de secciones dispuestas para el examen microscópico, son precisas varias operaciones. Suponiendo que partimos de un objeto colorado *in toto*, y conservado en alcohol de 70 por 100, siguiendo estrictamente el método usado en la Estación, se deberá:

- 1.º Endurecerle y deshidratarle,
- 2.º Embeberle en parafina,
- 3.º Seccionarle, y
- 4.º Disponer las secciones en series;

y este orden seguiré en su descripción, aunque intercalando algunos procedimientos que pueden ser de utilidad.

Endurecimiento y deshidratación.

En la mayor parte de los laboratorios se siguen aún los procedimientos de endurecer con el ácido crómico, líquido de Müller, etc., etc., descritos en todos los tratados de técnica microscópica, pero en la Estación de Nápoles se han abandonado por

(1) El lector que desee conocer algunos detalles sobre este punto, podrá leer con fruto un artículo del Dr. Whitman, publicado en el *American Naturalist* (Enero de 1883), titulado «La orientación de las secciones microtómicas y el método de *reconstruir* los objetos;» y también otro del Dr. Born, que trata del mismo objeto, publicado en la citada Revista (1884, página 446), y en *Journal of the Royal Microscopical Society* (Agosto de 1884, pág. 634).

completo. No se usa otro líquido para endurecer que el alcohol; y preciso es confesar, que empleado convenientemente, no tiene sustituto, y que ninguno le iguala en sus efectos; pero para ello es preciso que el ejemplar haya sufrido el tratamiento preliminar que queda expuesto, pues los inconvenientes de introducir directamente los animales en alcohol para matarlos, los he señalado ya. Un ejemplar, tratado del modo dicho, es perfectamente penetrable al alcohol de 70 que le sirve de líquido conservador; y para endurecerlo, con objeto de que adquiriera la resistencia necesaria para que pueda reducirse á secciones muy delgadas, bastará deshidratarle, pasándolo sucesivamente á alcoholes de 80, 90 y 95 por 100, y, finalmente, al absoluto. Si los tejidos fuesen muy delicados y se temiese que experimentasen una contracción perjudicial, se podrán usar alcoholes que difieran ménos en su tanto por 100; pero en todos casos conviene dejarlos en cada alcohol hasta que estén completamente saturados, y emplear la cantidad de líquido suficiente para que su título no baje de un modo sensible al introducir el objeto. De esta manera se obtiene el endurecimiento y la deshidratación, que son necesarios para la imbibición en la parafina, usada casi siempre en la Estación.

Empleando como materia de imbibición sustancias acuosas, tales como el jabón, goma ó gelatina, no hace falta la deshidratación, y sí sólo el endurecimiento, lo mismo que, cuando en lugar de la imbibición, se usa la inclusión. Al tratar de cómo

deben montarse las secciones en bálsamo del Canadá, diré el procedimiento que se sigue para pasar á este medio resinoso desde uno acuoso; esto es, de deshidratarlas sin tener en cuenta el endurecerlas.

Pasaré por alto el método de endurecer por el frío, y el uso de los microtomos heladores (*freezing*), porque no es á propósito para disponer las secciones en series, y por lo tanto para los estudios morfológicos; y además no he tenido ocasión de estudiarlo prácticamente. Su principal aplicación se encontrará en las investigaciones histológicas, sobre todo cuando convenga estudiar los tejidos lo más frescos posible.

Imbibición.

La *inclusión* consiste en rodear el objeto de una sustancia conveniente, de modo que contraiga íntima adherencia con sus paredes, sin penetrar en su interior. La *imbibición*, por el contrario, supone completa penetración de la sustancia en las más pequeñas cavidades é intersticios que dejan entre sí los tejidos. Casi todas las sustancias que sirven para la imbibición pueden emplearse también para la inclusión, cambiando el modo de usarlas; y en general pueden dividirse en dos grupos, según que sean solubles en líquidos acuosos ó no. En esta última categoría está la parafina, de uso casi exclusivo en la Estación, y que da siempre buenos resultados, excepto en aquellos pocos casos en que

el objeto no pueda resistir la deshidratación. El procedimiento para emplearla se divide en dos partes: *a)* en pasar el ejemplar del alcohol absoluto á un líquido disolvente de la parafina, y *b)* en embeberlo en esta última sustancia.

a.) La esencia de trementina, de clavo, y la creosota, han sido empleadas sucesivamente, lo mismo que el éter sulfúrico, como disolventes de la parafina; pero desde que Giesbrecht—antes que el Profesor Bütschli—propuso el cloroformo, han sido abandonadas, pues presenta éste la ventaja real sobre aquellas, de producir en mucho menor grado el encogimiento y distorsión de los tejidos.

El cloroformo debe impregnar por completo el ejemplar, de modo que no quede ni la más mínima cantidad de alcohol; y para que los tejidos delicados no sufran por la violenta osmósis que se produce al ser reemplazado el alcohol por un líquido de tan diferente densidad como es el cloroformo, conviene que la sustitución se haga del modo más lento posible. Para esto el Dr. Giesbrecht propone el siguiente método, que tiene aplicación en todos los casos análogos, (agua, alcohol y glicerina) y que consiste en poner en un vaso ó tubo un poco de alcohol absoluto, y luego, por medio de una pipeta, se dejan caer unas cuantas gotas de cloroformo, que irán al fondo, quedando los dos líquidos divididos. Después, se coloca con cuidado el objeto en el alcohol, que ocupa la parte superior, y se quita toda la cantidad que no sea necesaria para cubrirle. El objeto quedará en la línea divisoria de los dos lí-

quidos, y el alcohol será reemplazado paulatinamente por el cloroformo, conociéndose que la sustitución es completa, en que se irá al fondo. A veces, si su densidad es poca, no va al fondo del todo, pero por los efectos de luz se distinguirá bien que está nadando por debajo de la línea de división entre el alcohol y el cloroformo. Si se quieren acabar de eliminar las últimas trazas de alcohol, se pondrá de nuevo el objeto en otro vaso con cloroformo puro, y debe tenerse la seguridad de que está *completamente* penetrado por éste, antes de proceder á la operación siguiente.

b.) La imbibición en la parafina puede hacerse de varias maneras, dando todas ellas buenos resultados, según los casos. El método seguido en la Estación es el siguiente: el objeto, colocado en un tubo de cristal con cloroformo, se pone en un baño de maría á la temperatura de 50° , y poco á poco se le añaden pedacitos de parafina, hasta que no disuelva más. De esta manera la sustitución del cloroformo por la parafina se hace con suavidad; y se conoce cuando la penetración es completa, en que dejan de salir burbujas del objeto. Es preciso, luego, quitar por completo el cloroformo, pues vuelve la parafina esponjosa é impropia para seccionar, y á ese fin pueden seguirse dos procedimientos. O bien se le deja evaporar lentamente á la temperatura de 50° C., ó se traslada el objeto á un baño de parafina pura. El primer medio es más largo, pues tardan mucho en acabarse de desprender las últimas porciones de cloroformo retenidas por la

parafina; pero tratándose de objetos muy pequeños puede emplearse. El segundo es más expedito, y da mucho mejores resultados, sobre todo tratándose de objetos de algunas dimensiones. De la disolución de la parafina en cloroformo se pasa el objeto á un baño de parafina pura, fundida á la temperatura de 50° C., y se le deja todo el tiempo necesario para que se penetre bien, desalojando todo el cloroformo.

El profesor Bütschli recomienda que el objeto se pase directamente del cloroformo á una solución de parafina en este último, saturada á 35° C.; y el profesor Kossmann, directamente á la parafina fundida; y de todos modos se pueden obtener buenos resultados, pues la condición esencial que hay que llenar es que, al final de la operación, el objeto esté penetrado completamente por parafina pura; y las precauciones que hay que tomar para que no se produzca distorsión en los tejidos, y la imbibición sea completa, dependen en gran parte de la naturaleza de los objetos.

Nada fijo puede decirse respecto del tiempo que necesita cada una de las operaciones de imbibición, pues es en extremo variable, desde media ó una hora, á dos ó tres días, según el tamaño y naturaleza de los objetos; y la única regla general que puede darse es que *la imbibición en el cloroformo y en la parafina deben ser completas; y que, como resultado final, debe quedar esta última sóla, procurando desalojar hasta las últimas trazas de cloroformo.*

No basta que las operaciones indicadas hasta ahora se hayan llevado á efecto en debida forma, para que se puedan obtener secciones bien iguales y muy delgadas, pues además es preciso que la parafina reúna ciertas condiciones. La primera es que sea pura, pues si tiene algo de esencia de trementina, cloroformo, creosota, aceite de parafina... etcétera, etc., al enfriarse forma una masa granulenta y quebradiza, ó bien esponjosa, que no se presta á dejarse cortar en secciones bien delgadas; y la segunda consiste en que su dureza, ó punto de fusión, guarde relación con la temperatura del laboratorio; pues si es demasiado dura, por quebradiza, y si demasiado blanda, por pastosa, no se pueden obtener secciones delgadas. Para eso es preciso procurarse parafina blanda y parafina dura, cuyos puntos de fusión sean de 36° y 56° (Kossmann), y mezclarlas en las distintas proporciones que la práctica enseñe como las más conveniente. En Nápoles, durante el invierno, la mezcla más conveniente es de dos partes de parafina dura, y una de parafina blanda; y, como regla general, puede decirse que una temperatura de 18° C. en el laboratorio, requiere una mezcla que se funda á unos 48° . Se conocerá que la dureza de la parafina es la conveniente, en que permite obtener secciones sumamente delgadas, transparentes, flexibles y elásticas, sin que sean quebradizas, ni se arruguen y peguen á la hoja de la navaja, por demasiado blandas.

Todas las operaciones que dejo descritas se facilitan extraordinariamente usando el baño de maría

del Dr. Mayer, lo mismo que la colocación de las secciones en serie, por los métodos que luego se dirán. El Dr. Whitman le describió en el «American Naturalist» (Octubre de 1882), pero posteriormente el Dr. Mayer le ha modificado mucho, como puede verse en el último cuaderno del «Mittheilungen» de la Estación, correspondiente al año de 1883, y en el último número, del mismo año, del periódico de la «Royal Microscopical Society.» Yo me sirvo de él diariamente, y le encuentro perfectamente adecuado también para las manipulaciones que exigen las preparaciones botánicas. Tiene varios agujeros cilíndricos, para introducir en ellos los tubos de cristal con los objetos en cloroformo, y también un termómetro que indique la temperatura del baño; y además cuatro tacillas de distinto tamaño y forma, para hacer la imbibición en la parafina. El centro está ocupado por una ranura, en la que pueden introducirse seis ú ocho *slides*, descansando de plano, cosa muy útil para la colocación de las secciones en serie (1).

Hecha la imbibición, es preciso dejar enfriar los objetos con cierta cantidad de parafina á su alrededor. Comunmente se usan para este objeto pequeñas cajas de papel, pero en la Estación se sustituyen,

(1) Después de presentada esta Memoria he visto la descripción de un ingenioso aparato, ideado por el Dr. Hoffmann, para efectuar la imbibición de los objetos en parafina, á baja presión. Para hacer el vacío emplea una corriente de agua, que obra á manera del vapor en el inyector Giffard. (Cuaderno correspondiente á Octubre de 1884 del *Jour. Roy. Micr. Society*, tomado del *Zool. Anzeig.*, VII, 1884, p. 230.)

con ventaja, por dos piezas de metal en forma de cuatro ó bayoneta, que se colocan, formando una caja, sobre una placa de cristal, cuyas dimensiones cambia aproximándolas ó separándolas. Para que la parafina no se salga por entre las junturas de las escuadras de metal y la placa de vidrio, pueden revestirse sus paredes con un poco de colodión, después de haberlas untado muy ligeramente con glicerina, para evitar toda adherencia. Evaporado el éter-alcohol del colodión, en el baño de maría, quedará una caja que podrá estar llena por mucho tiempo de parafina líquida, sin que se salga, y así, tratándose de objetos pequeños, se podrá llevar bajo el microscopio de disección, y colocarlos en una posición conveniente. Es preciso que al enfriarse la parafina lo haga lentamente, para que su estructura quede bien uniforme.

En lugar de la parafina, el Dr. Kleinenberg recomienda una mezcla de cuatro partes de espermaceti y una de aceite de castor, que se funde á los 45° C. El Dr. Strasser añade á esta composición tres ó cuatro partes de sebo. El Dr. Seiler mezcla dos partes de parafina y una de sebo de carnero, y finalmente, el Dr. Schulgin propone una mixtura de ceresina y vaselina. No diré que todas estas mezclas no puedan ser de utilidad, pero sí que he visto trabajar, y he trabajado en la Estación de Nápoles, con parafina pura, y las secciones que se obtienen son tan perfectas, que difícilmente con ninguna otra sustancia se podrán aventajar.

Sucede algunas veces que objetos muy delicados

no permiten la imbibición en parafina, y entonces es preciso emplear una *masa acuosa*, tal como el jabón, la goma arábica, la gelatina, la mezcla de yema y clara de huevo (método Calberta) la *celoidina*, etc., etc., métodos todos que pueden prestar buenos servicios en determinados casos, y que están descritos en los tratados de técnica microscópica. Recientemente el Dr. Thoma, profesor de Anatomía patológica de la Universidad de Heildeberg, ha publicado en el periódico bi-mensual de la «Royal Microscopical Society» una detallada descripción del procedimiento Calberta, y varias observaciones sobre la *celoidina*, que creo pueden ser de gran utilidad á los que se dedican á estudios de microscopia (1).

El Dr. Mayer ha encontrado un nuevo procedimiento con la gelatina, que se usa en la actualidad en Nápoles. Hasta ahora esta sustancia, ya usándola mezclada con glicerina (Dr. Keiser) ó bien de la manera ordinaria, y endureciéndola luégo con alcohol, presentaba el inconveniente de su elasticidad, que es lo que ingeniosamente ha tratado de evitar el Dr. Mayer, de esta manera. Después de liquidada la gelatina, de la manera ordinaria, se le

(1) El procedimiento de la *celoidina* parece que va adquiriendo algún favor entre los microscopistas. La *celoidina* se vende en placas parecidas á las de gelatina (5 fr. el paquete—Schering, Berlín), y para el modo de usarla pueden verse, además del artículo citado, los de Mr. Karop (*Jour. Quek. Micr. Club*, 1, 1884, y *Jour. Roy. Micr. Society*, 1884, p. 313); de Mr. Freeborn (*Am. Month. Micr. Jour.*, v, 1884, p. 127), y de Schiefferdecker (*Jour. Roy. Micr. Society*, 1884, p. 819).

añade $\frac{1}{4}$ ó $\frac{1}{3}$ de su volumen de aceite de castor, y se agita bien con objeto de que la mezcla ó emulsión se haga del modo más perfecto posible; y cuando esté á punto de enfriarse, se vierte en un recipiente y se deja coagular. El aceite de castor se extrae luego introduciendo la masa en alcohol de 90 por 100, y la gelatina queda como una sustancia finamente porosa—una especie de médula de saúco artificial—que se deja cortar perfectamente en secciones delgadas.

Cortar las secciones.

Preparados los objetos de la manera dicha, el seccionarlos, ó reducirlos á secciones *delgadas y paralelas, y de igual espesor*, se hace según los procedimientos generales que se encuentran descritos en las obras de microscopia. Mucho contribuye al éxito de la operación la habilidad personal; pero no por eso tiene ménos influencia el uso de un buen microtomo, y, *sobre todo*, el que el objeto haya sido *bien preparado*. El microtomo en uso en la Estación es el del Dr. Thoma, modificado por el Dr. Mayer, y construído por R. Yung (Heildeberg, Hauptstrasse, 15). Es del tipo Rivet, y el más completo y perfeccionado de cuantos he visto, estando todo él dispuesto especialmente para cortar objetos embebidos en parafina, ó en otra sustancia análoga. Su descripción (1), escrita en inglés por el

(1) Microtomos buenos son también los de Zeiss, Reichert, etc.

mismo Profesor Thoma, puede verse en el cuaderno de Abril de 1883 de la «Royal Microscopical Society»; y los últimos perfeccionamientos en él introducidos, en un artículo publicado por los Auxiliares de la Estación, Doctores Andrés, Giesbrecht y Mayer, en el último cuaderno del «Mittheilungen» del 1883 (1). Entre ellos figura en primera línea el *carretón* porta-objeto, que puede tomar toda clase de inclinaciones, cosa sumamente útil para colocar el objeto en una posición determinada; y un aparatito *aplanador de secciones* (*Schittstreckers, Section-flattner*) que se coloca sobre la lámina de la navaja é impide que las secciones se arrollen. Cuantos hayan empleado el método de imbibición en la parafina saben el fastidio que causa el arrollamiento de las secciones, que es imposible algunas veces extender sin que se rompan; y para impedirlo se han propuesto algunos medios, pero hasta ahora ninguno tan real y efectivo como el aparato Andrés, Giesbrecht y Mayer, que obra de un modo automático, sin exigir ningún cuidado de parte del operador. Este aparato se puede también usar con los microtomos de platina (tipo Ranvier), pues para ello el Dr. Mayer tuvo la bondad de idear una pequeña modificación, á petición mía.

(1) Puede verse también la descripción de estos perfeccionamientos en el *Journal de Micrographie* (1883) y en el *Journal of the Royal Microscopical Society* (1883). En este último se encontrará, además, la descripción de *aplanador de secciones* de Decker, Francotte, Gage y Smith, y Kingsley. (Números correspondientes al año 1884.)

Montar las secciones en series.

Obtenidas ya las secciones *planas, de igual espesor y paralelas*, es preciso colocarlas en *serie*, esto es, una al lado de otra, en el mismo orden en que se encuentran en el objeto; y *orientarlas* de la misma manera, colocándolas paralelamente á una línea determinada. Para efectuar esta orientación bastará un poco de cuidado; y si el objeto es muy pequeño, puede emplearse este sencillo procedimiento. En el *bloque* de parafina en que está incluido, se hacen una ó dos caras planas verticales, y así en cada sección habrá dos lados rectos, que se tendrá cuidado de ir colocando homológamente, y paralelos á sí mismos. De esta manera, y por el mismo orden que se vayan obteniendo, se irán disponiendo, en una ó varias filas, una tras otra, las secciones hasta llenar el *slide*, y lleno uno se empezará con otro de igual suerte, anotando su número de orden, hasta que se haya seccionado todo el objeto. De este modo se tendrán 10, 20, 30 ó más *slides*, con cierto número de secciones cada uno; y en su conjunto representarán la serie de 200, 300 ó más secciones en que se ha dividido el objeto. Veamos ahora el modo de fijarlas.

Todos los que han trabajado con el microscopio saben las dificultades con que se tropieza cuando se quieren colocar simétricamente dos ó tres objetos en una misma preparación, dificultades que acaban con la paciencia del operador. ¿Cómo se había, pues,

de conseguir colocar una serie de 200 ó 300 secciones, antes de que Giesbrecht encontrase el medio de hacerlo? Por eso su procedimiento le ha valido los plácemes de todos los microscopistas, además de una recompensa del Gobierno de Prusia, y ha sido uno de los triunfos de la Estación.

Giesbrecht publicó su método en 1881, y posteriormente, en 1883, Frenzel, Threlfall, Schällibaum y Mayer han dado á conocer otros, que si bien se fundan en el mismo principio, emplean distintas sustancias. Todos ellos los describiré, porque creo que su conocimiento es de la mayor importancia á cuantos se dedican á la micrografía.

a.) *Método Giesbrecht. (Goma laca.)*—Una parte de goma laca se disuelve en 10 de alcohol absoluto, y se filtra. Debe tenerse cuidado en elegir la goma bien clara y transparente, para que la solución tenga poco color. (La goma laca blanca no es soluble en alcohol). Una varilla redonda de cristal se moja en esta solución, y luego se pasa de plano sobre la cara del *slide*, calentado de antemano, y así se extiende sobre él una capa de goma *bien delgada y muy uniforme*, que se seca al instante; y no sería perceptible á no ser por los colores de interferencia que por reflexión se producen en sus bordes. De esta manera se pueden preparar muchos *slides*, y guardarlos para cuando hagan falta.

Un momento antes de empezar á cortar las secciones de la manera dicha (imbibición en parafina), se humedece la capa de goma laca de un *slide* con un pincel mojado en creosota, y luego se colocan

en él las secciones, unas tras otras, á medida que se van cortando; y cuando esté lleno, se calienta sobre un baño de maría á 50° C. por espacio de 15 minutos, con objeto de que la creosota se evapore y la parafina de las secciones se liquide, haciendo lo cual las abandona, y quedan fijas en la capa de goma laca. Entonces no hay inconveniente en dejar caer sobre ellas, por medio de una pipeta, unas cuantas gotas de esencia de trementina, con objeto de lavarlas de la parafina; y después de bien escurrida ésta, se pone una gota de bálsamo del Canadá disuelto, y se cubre con el *cover*, quedando terminada la operación. De esta manera se pueden colocar docenas de secciones en un sólo *slide*, sin que se muevan lo más mínimo de la posición en que se hayan dispuesto; y el acabado es tan perfecto como el de cualquier otra preparación en bálsamo, sin que se conozca en nada la goma laca.

Este procedimiento se funda en que la creosota disuelve la goma laca y la parafina, y la esencia de trementina sólo esta última. El bálsamo del Canadá debe estar disuelto en una sustancia que *no disuelva* la goma laca.

El baño de maría del Dr. Mayer facilita mucho este procedimiento—lo mismo que los siguientes—pues mientras se está calentando un *slide*, se disponen las secciones en otro, y así se trabaja sin interrupción.

b.) Métodos Frenzel y Threlfall. (Gutapercha y Cautchuc).—Uno de los inconvenientes del método Giesbrecht, es que si el objeto no ha sido teñido *in*

toto, las secciones no se pueden colorar. Para evitar esto, Frenzel, Threlfall, Schällibaum y Mayer, han modificado el procedimiento, empleando en lugar de la goma laca, la gutapercha, el cautchuc, el colódion y la albúmina; y de esta manera las secciones, fijadas en el *slide*, se pueden teñir por los diversos procedimientos de la doble ó simple coloración expuestos anteriormente; é inútil es decir que tienen también aplicación en el caso de coloración *in toto*, de igual manera que el de Giesbrecht.

Frenzel publicó su método antes que Threlfall, pero á las observaciones de éste le abandonó, ajustándose en un todo al de Threlfall, y conservando del suyo únicamente el empleo de la gutapercha. En la actualidad, pues, se diferencian sólo los dos métodos en la sustancia de que se sirven para fijar las secciones sobre el *slide*. El modo de operar es el siguiente.

Se hace una solución bien clara de gutapercha en cloroformo ó bencina (1 : 100), y para ello es preciso dejarla dos ó tres semanas antes de filtrarla, agitándola frecuentemente. Con una varilla de cristal, como en el método Giesbrecht, ó bien de la manera que los fotógrafos colodionan las placas, se extiende una capa de esta solución sobre el *slide*—procurando que esté perfectamente limpio—y se deja secar. De esta manera pueden prepararse muchos cristales de antemano.

Las secciones, á medida que se obtienen, se colocan sobre la capa de gutapercha; y una vez lleno el *slide* se pone en un baño de maría de 50° C.,

hasta que, fundiéndose la parafina abandone las secciones, y la gutapercha, vuelta viscosa por el calor, las retenga y fije á la lámina de cristal. Hecho ésto se deja enfriar, y con objeto de disolver la parafina, por medio de una pipeta se vierte sobre las secciones una cantidad abundante de aceite de nafta, ó de parafina, teniendo en cuenta que su acción disolvente es tanto mayor, cuanto menor sea su punto de ebullición.

Si el objeto de que proceden las secciones ha sido colorado *in toto*, la preparación se acaba como en el procedimiento Giesbrecht, teniendo cuidado que el disolvente del bálsamo no lo sea á la vez de la gutapercha; pero en el caso contrario, después de bien lavadas las secciones con el aceite de nafta, se introduce el *slide* en un baño de alcohol absoluto, luego de alcohol de 90 por 100, después de 80, y así sucesivamente, hasta llegar al grado alcohólico de la solución colorante, ó á la hidratación completa. Una vez teñidas las secciones, y bien lavadas del modo que queda dicho, poco á poco, y por grados, se vuelven á deshidratar hasta el alcohol absoluto, esencia de clavo ó de espliego, y se acaba la operación con bálsamo, de la manera ordinaria. Si se ha operado bien, durante todas esas manipulaciones las secciones no habrán hecho el más pequeño movimiento, y continuarán en la misma disposición en que se colocaron al principio.

Si el ácido fénico no tuviese acción sobre la gutapercha (?) se podría usar con ventaja en el procedimiento de deshidratación é hidratación, de la ma-

nera que luégo diré; pero no he tenido ocasión de observarlo, pues siempre he seguido el procedimiento que acabo de describir.

Cuando las secciones son muy pequeñas, para asegurarlas más, y evitar el peligro de que se muevan durante los lavados sucesivos, el Dr. Frenzel recomienda que cuando el aceite de nafta se haya evaporado casi del todo, se deje caer sobre ellas una gota de la solución de gutapercha, y después de seca se continúa el tratamiento por el alcohol, etcétera, etc. La gutapercha no penetra los tejidos, y sólo sirve para fijar más las secciones al *slide*, permitiendo que los líquidos colorantes las penetren por completo.

El procedimiento de Threlfall es exactamente el que acabo de describir, con sólo cambiar la gutapercha por el cautchuc. Estas dos sustancias presentan sus ventajas é inconvenientes. El cautchuc, por ejemplo, es más fácil de disolver en la benciná y en el cloroformo, y la capa que se extiende sobre el *slide* se seca antes; pero en cambio, la gutapercha se adhiere mejor, siendo siempre algo viscosa, de modo que no llega nunca á secarse por completo; y es ménos soluble en el aceite de nafta, y por lo tanto las secciones corren menos peligro de ser movidas.

Según Mr. Threlfall su método tiene sobre el de Giesbrecht las siguientes ventajas: 1.º La capa de cautchuc es más uniforme que la de goma laca, y fija con más seguridad los objetos pequeños. 2.º Como la capa de cautchuc está seca, al poner sobre ella

las secciones, permite que se arreglen con más comodidad en la posición que se desee. 3.º El aceite de nafta disuelve con más facilidad la parafina, que la esencia de trementina.

c.) *Método Schillibaum. (Colodión).* — Una parte de colodión se mezcla con 3-4 (según su consistencia) de aceite de clavo ó de espliego; y con un pincel se extiende una capa de esta mezcla sobre el *slide*, que debe haberse limpiado perfectamente. Esta capa permanece en estado semi-líquido por bastante tiempo, y sobre ella se colocan las secciones ú objetos; y una vez arreglados se calienta el *slide* á 45° ó 50° C. hasta que la esencia de espliego ó de clavo se hayan evaporado, lo que de ordinario se efectúa á los 10 ó 15 minutos. Las secciones entonces están completamente fijadas y pueden tratarse por el alcohol, agua, cloroformo, esencia de trementina, etc., etc., pues ninguna de estas sustancias disuelve la nitro-celulosa.

Mr. Gage emplea el colodion y la esencia de clavo separadamente, de esta manera: Primero, extiende una capa de colodion sobre el *slide*, y la deja secar; y luégo, con un pincel fino, humedece la superficie colodionada con esencia de clavo y coloca las secciones, terminando la preparación de la manera dicha.

Este procedimiento lo he empleado mucho para fijar en serie secciones vegetales, pues no es necesaria la imbibición en parafina; y después pueden igualmente montarse en bálsamo ó en glicerina. Las secciones mojadas en alcohol, tal como se van ob-

teniendo, se colocan unas tras otra sobre el *slide*, y después de evaporada la esencia de clavo quedan fijas, y en disposición de ser coloradas.

d.) *Método Mayer. (Albúmina).*—El Doctor P. Mayer (Asist. de la Estación) emplea como sustancia fijante la albúmina. Una cantidad de clara de huevo, bien filtrada, se mezcla con igual volumen de glicerina; y con un pincel fino se extiende una capa de la mezcla sobre el *slide*. Luégo se colocan las secciones, del modo indicado, y se calienta el *slide* en el baño de maría, con objeto de coagular la albúmina. El tratamiento ulterior es igual al del método anterior; y para teñir recomienda el Doctor Mayer el carmín alumbre ó alcohólico, según la fórmula que en su lugar se ha indicado.

Este método dará buenos resultados en los mismos casos que el anterior, y sobre todo es útil cuando no se emplee la parafina como sustancia de imbibición.

Estos cuatro métodos para fijar las secciones en serie, tienen también aplicación cuando se trata de objetos pequeños ó animales. Para ello es preciso que estén embebidos en un líquido que disuelva la sustancia que sirve para fijar: esencia de clavo ó creosota, si se trata del método Giesbrecht, ó bencina si del de Frenzel y Threlfall.

Como *medium* para montar los objetos y secciones se usa en la Estación, casi exclusivamente, el bálsamo del Canadá, disuelto en alguno de los líquidos que ordinariamente se emplean para ese ob-

jeto; lo que obliga á la deshidratación de los ejemplares, deshidratación que se hace por medio del alcohol, de la manera dicha; y luégo se tratan por la creosota ó esencia de clavo, antes de ponerlos definitivamente en el bálsamo. Este procedimiento da casi siempre los mejores resultados, sobre todo bajo el punto de vista de la conservación de las preparaciones; pero hay que tener presente que la visibilidad de las estructuras pequeñas es proporcional á la diferencia entre los índices de refracción del objeto y del *medium* en el cual está preparado; y por lo tanto es bueno no ser exclusivista en este punto, y adoptar, según convenga, la glicerina, el Styrax ó el Liquidambar, usados por Van Heurck para las Diatómeas, el monobromuro de naftalina, etcétera, etc., siempre con el fin de obtener una diferencia de índices conveniente, ya que aquí no se trata de aprovechar toda la abertura de los objetivos de inmersión homogénea, que rarísimas veces se presentará ocasión de usar en los estudios morfológicos. La glicerina gelatinizada da muy buenos resultados; y para preparaciones vegetales, después de haberla usado largo tiempo, la encuentro superior al bálsamo. En la Estación Zoológica me serví también de ella, para evitar la deshidratación en los animales blandos y delicados. Los pequeños ejemplares de *Salpa democratica*, por ejemplo, después de teñidos por el carmín borácico, presentan con gran claridad los núcleos y estructura de los arcos musculares, mientras que con el bálsamo apenas son visibles, ó cuesta gran trabajo distinguir.

En lugar del procedimiento de deshidratación por medio del alcohol, en muchos casos habrá ventaja en emplear el ácido fénico, que creo ha de ser de uso muy común en microscopía cuando sus propiedades sean más conocidas. En América hace ya algunos años que se emplea, y creo sería de los primeros en usarlo Mr. Ralph, presidente de la Sociedad de microscopía de Victoria; y en los periódicos que en Europa se publican, dedicados á esa ciencia, y que he tenido ocasión de examinar, nada he encontrado anterior á la descripción que Mr. Goldstein hace del «Ralph's carbolic process», y que copia en su cuaderno de Octubre de 1880, la «Royal Microscopical Society.» Posteriormente Mrs. Fell y Pow han publicado algunas notas sobre el particular, en el «American monthly microscopical journal.»

Las principales propiedades del ácido fénico consisten en que penetra con suma rapidez los objetos, y expulsa el aire contenido en los tejidos, sin producir distorsión ni endurecimiento; y además, en que se mezcla lo mismo con el agua y la glicerina, que con el bálsamo del Canadá. Presenta, pues, las buenas propiedades del alcohol absoluto, sin sus defectos; y en microscopía se le debe considerar como un alcohol, y nó como un ácido. Pero para que tenga esas buenas propiedades que acabo de enumerar, es preciso que esté disuelto en la menor cantidad de agua posible, *sólo en la estrictamente necesaria* para que esté líquido á la temperatura ordinaria. Para usarlo bastará sumergir el objeto en la solución durante dos ó tres minutos, tiempo

suficiente para que lo penetre del todo, y entonces, y sin más operación, está dispuesto para montarlo en bálsamo ó en glicerina, de la manera ordinaria. Ya se comprende también el uso que se puede hacer de esta sustancia como medio deshidratante, evitando el largo procedimiento del alcohol; y habrá también ventaja en su empleo cuando se quieran transparentar objetos opacos, pues posee esta propiedad en alto grado, lo que no deja de ser un inconveniente tratándose de objetos muy transparentes ya de por sí.

En preparaciones botánicas me he servido mucho del ácido fénico, siempre con los mejores resultados; pero debe usarse con precaución en los cortes teñidos por colores de anilina, pues he notado que los decolora, aún después de haber sido bien lavados con alcohol.

Literatura relativa á los procedimientos para seccionar y montar las secciones:

Dr. P. Mayer, *M. T. Zool. Stat. Neap.*, II (1880), p. 1-27.—Mr. Whitman, *Amer. Nat.*, XVI (1882), p. 772.—Dr. Giesbrecht, *Zool. Anzeig.*, IV (1881), p. 483; *M. T. Zool. Stat. Neap.*, IV (1881), página 184.—Andrés, Giesbrecht y Mayer, *M. T. Zool. Stat. Neap.*, IV (1883).—Dr. Seiler, *Compendium Micros. Technology*; Dr. Schulgin, *Zool. Anzeig.*, VI (1883), p. 21.—Dr. Prof. Kossmann, *Zool. Anzeig.*, VI (1883), p. 19.—Prof. Keiser, *Bot. Centralb.*, I (1880), p. 25.—Bütschli, *Biol. Centralb.*, I (1881), p. 591.—Prof. Thoma, *Jour Roy.*

Micr. Soc., (1883), p. 298.—Frenzel, *Zool. Anzeig.*, vi (1883), p. 21.—Threlfall, *Zool Anzeig*, vi (1883), p. 300.—Schällibaum, *Arch. f. Mikr. Anat.*, xxii (1883), p. 689.—Mr. Goldstein, *Jour. Roy. Micr. Soc.*, Octobre (1880), p. 858.—Mr. Fell, *Proc. Am. Soc. Micr.*, (1881), p. 87.—Mr. Pow, *Am. Month. Micr. Jour.*, iv (1883), p. 8.



