

## Tesis de Posgrado

# Fermentación de glucosa por bacterias del género *Aerobacter*

Cánepa, Delia Rosa

1935

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Química de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Cánepa, Delia Rosa. (1935). Fermentación de glucosa por bacterias del género *Aerobacter*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_0183\\_Canepa.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0183_Canepa.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Cánepa, Delia Rosa. "Fermentación de glucosa por bacterias del género *Aerobacter*". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1935. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_0183\\_Canepa.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0183_Canepa.pdf)

FERMENTACION DE GLUCOSA POR BACTERIAS DEL GENERO AEROBACTER

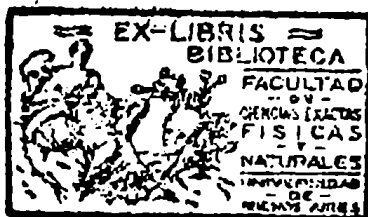
TESIS

PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTORA EN QUIMICA

POR

DELIA ROSA CANEPA

*Tesis 183*



BUENOS AIRES

1935

PADRINO DE TESIS

DOCTOR ALFREDO SORDELLI

## INTRODUCCION

El estudio de los procesos metabólicos de las bacterias constituye uno de los problemas mas interesantes de la fisiología microbiana y una a su propia importancia, la de ser un posible camino para el conocimiento de las transformaciones químicas que tienen lugar en los organismos superiores.

Cuando se trata de penetrar en la intimidad de estas actividades de los microorganismos, no son pocas la dificultades que se presentan, y en el caso particular de los procesos de fermentación bacteriana, uno de los cuales es el objeto de este trabajo, el número considerable de sustancias que se forman a partir de un compuesto mas o menos sencillo, tal como la glucosa por ejemplo, y la proporción entre las cantidades de los distintos productos, que varía según las condiciones en las cuales se realiza el proceso, son dos circunstancias que complican aun mas la interpretación de las transformaciones que sufre el sustrato. Si a estas dificultades, que se pueden considerar de orden teórico, se suman las que implica el separar y dosificar sustancias de especie química semejante, como son en general los productos que aparecen en una fermentación, en un medio de cultivo, resalta inmediatamente el valor de los estudios realizados en el viejo Laboratorio de Microbiología del Profesor Beijerinck, en la Escuela Técnica Superior de Delft, por su sucesor Kluyver y sus discípulos, estudios que dieron por resultado interpretaciones claras de mecanismos complejos y que tienen sobre todo el mérito de haber

sido encarados en una forma inteligente y lógica que no tiene precedentes. Creo innecesario recalcar la importancia de las investigaciones efectuadas en Delft, importancia que se aprecia en la breve reseña de los Estudios sobre fermentación de glucosa por miembros del Género *Aerobacter* y afines, que figura en un próximo capítulo.

Fué el Prof. Ing. S. Soriano, que ha estado en el citado Laboratorio, quien me sugirió la posibilidad de estudiar una fermentación siguiendo las técnicas de los discípulos de Kluyver, tipo de investigación que no se había hecho hasta entonces en la Universidad de Buenos Aires ( 1 ), y debo agradecerle además de sus muchas indicaciones el que me haya facilitado la Tesis de Scheffer (33), realizada en dicha Escuela, que fué una importante ayuda para mí.

Quiero expresar sobre todo mi reconocimiento hacia el Prof. Dr. Alfredo Sordelli, quien ha dirigido con el mayor interés mi tesis de Doctorado, proporcionándome al mismo tiempo todas las facilidades posibles, para realizarla en los laboratorios del Instituto Bacteriológico del Departamento Nacional de Higiene que esta bajo su digna dirección, circunstancias a las que debo el haber obtenido los resultados que presento en este trabajo.

( 1 ).-Este trabajo fué iniciado simultáneamente con el del Dr. G. S. de la Serna ya presentado.

## BREVES CONSIDERACIONES SOBRE EL GENERO AEROBACTER

## ELECCION DE LAS CEPAS A ESTUDIAR

De acuerdo con el "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" el género *Aerobacter* tiene en la sistemática la siguiente ubicación:

Familia...BACTERIACEAE COHN 1872.-Bastoncitos no esporulados, móviles o no, de metabolismo complejo, utilizan aminoácidos y generalmente hidratos de carbono.

Tribu....Bacteriaceae Committee S.A.B. 1920.-Bastoncitos Gram negativos, comunmente existentes en el intestino de los animales; crecen bien en medios artificiales; muchas especies atacan hidratos de carbono formando ácido y gas o ácido solamente; relativamente pocas especies licuan la gelatina; cuando son móviles los flagelos son por lo general peritricos.

Géneros de la tribu Bacteriaceae

A. Fermentan glucosa con formación de ácido o ácido y gas

1. Forman ácido o ácido y gas de lactosa

a. No forman acetilmetilcarbinol

b. No licuan la gelatina

Género Escherichia

aa. Forman acetilmetilcarbinol

b. Pueden licuar la gelatina o no.

Género Aerobacter

2. No forman ácido o gas de la lactosa

a. Algunas especies forman ácido y gas de sacarosa

b. Licuan gelatina

Género Proteus

aa. No forman ácido o gas de sacarosa

b. No licuan gelatina

Género Salmonella

AA. Fermentan glucosa con formación de ácido pero no gas

a. Móviles

Género Eberthella

aa. No móviles

Género Shigella

AAA. No forman ácido o gas de hidratos de carbono

1. Crecen en medios que contienen fucsina básica o tionina

Género Bruceella

2. No crecen en medios que tienen fucsina básica o tionina

Género Alcaligenes

Dado el interés que tienen los gérmenes del grupo "coli-aerógenes", considerado así por la estrecha relación entre ambos géneros, desde el punto de vista sanitario de las aguas de consumo, los investigadores americanos han intensificado su estudio durante los últimos años sobre todo en lo que se refiere a las características diferenciales y a su relación con la contaminación fecal del agua. Se han hecho también, como puede verse en el próxi-

mo capítulo, muchas investigaciones donde se trata de establecer que diferencias, en lo referente a la fermentación de hidratos de carbono, separan el E. coli (germen tipo del género Escherichia) del A. aerógenes (germen tipo del género Aerobacter) lo que puede tener valor para la correcta clasificación.

Aún cuando el carácter diferencial entre ambos géneros es la producción de acetilmetilcarbinol, que como demostró Harden (17) es la sustancia a la cual se debe la reacción de Voges-Proskauer que siempre se usa, además de las técnicas indicadas ultimamente (26, 27, 41) , para comprobar la presencia del carbinol, los investigadores americanos hacen en general tres ensayos para distinguir E. coli de A. aerógenes:

- 1° Reacción de Voges -Proskauer
- 2° Reacción del rojo de metilo (determinar el pH usando rojo de metilo como indicador en un cultivo de 3 o 4 días en caldo glucosa)
- 3° Desarrollo en el medio de Koser (significa capacidad para utilizar el radical citrato como única fuente de carbono)

Con respecto a estas tres características, entre otros Koser en 1924 (25), Ruchhoft, Kallas, Chin y Coulter en 1931 (32) Werkman y Guillen en 1932 (42), France en 1933 (9) señalaron la existencia de gérmenes de comportamiento intermedio para los cuales Werkman y Guillen propusieron crear un nuevo género en la tribu Bacterieae.

Por otra parte algunos autores y entre ellos Scheffer consideran un solo género, Bacterium, en la tribu Bacterieae, en el



cual se encuentran las especies que para otros pertenecen a géneros diversos.

No he querido con esto entrar en un problema de sistemática, ajeno a mi tesis, sino hacer notar que no hay acuerdo en la clasificación de los gérmenes del llamado "grupo coli" y que por lo tanto son siempre de gran interés las investigaciones relacionadas con ese asunto.

Las cepas que elegí para estudiar la fermentación de glucosa están identificadas con los números 3094, 50 forma capsulada y 50 forma no capsulada.

El n° 3094 es el B. aerógenes de la colección del Laboratorio de Microbiología de Delft, traído por el Ing. S. Soriano.

Según Scheffer el germen que en su clasificación denomina B. aerógenes corresponde al Aerobacter aerógenes de la sistemática americana, pero de acuerdo con las observaciones del Ing. Soriano y de A. Rivas, de la sección Higiene del Instituto Bacteriológico, el n° 3094 es un germen que fermenta la dulcita y no fermenta la adonita por lo cual no coincide con el Aerobacter aerógenes de la clave de Bergey. Sin embargo debo admitir que para Scheffer el n° 3094 corresponde al B. aerógenes puesto que es el germen tipo de la colección del Laboratorio de Delft. Las diferencias encontradas por el Ing. Soriano y el Sr. Rivas entre este germen y el Aerobacter aerógenes (Bergey) se pueden atribuir al uso de un mayor número de propiedades que las tenidas en cuenta por Scheffer, como ser la fermentación de distintos hidratos de carbono.

Por otra parte, en el estado actual de la sistemática, la clasificación exacta de un germen del grupo coli es un problema bastante complicado.

El germen n° 50 fué aislado de materia fecal en el Instituto Bacteriológico por H. Sosa quien encontró al mismo tiempo la disociación en las dos formas, mucosa y no mucosa; de un cultivo que obtuvo por aislamiento monocelular el Ing. Soriano, fueron aisladas ambas formas: la no capsulada que no varia y la capsulada que se puede disociar después de un tiempo de cultivo.

Como pude comprobar el germen n° 50 responde a las exigencias del género *Aerobacter* y según las observaciones del Ing. Soriano y de A. Rivas coincide con el *Aerobacter aerogenes* de la clave de Bergey.

REVISTA GENERAL DE LOS TRABAJOS REALIZADOS SOBRE FERMENTACION DE HIDRATOS DE CARBONO POR MIEMBROS DEL GENERO AEROBACTER Y AFINES. ( I )

En 1901 Harden (15), con el objeto de encontrar algunas características que diferencian entre si a los gérmenes del grupo coli y se puedan tener en cuenta desde el punto de vista de la clasificación, hace determinaciones cuantitativas de los productos de fermentación de azúcares por estos organismos. Estudia la acción sobre la glucosa del B. coli communis y del B. typhosum, por considerarlos términos extremos de dicho grupo. Además examina con detalle la acción del B. coli sobre manita y fructosa.

Los productos de fermentación de glucosa por estos organismos son: ácido láctico, ácido succínico, ácido fórmico, ácido acético, alcohol, anhídrido carbónico e hidrógeno.

Dejando para otro capítulo la consideración de sus métodos de trabajo, daré aquí el resultado de sus experiencias y las conclusiones teóricas a que estas lo llevan.

En ningún caso los productos de fermentación representan la totalidad del azúcar consumida. Con el B. coli, por ejemplo, hay un déficit de  $1/12$  a  $1/8$  del carbono total, cuyo origen no puede precisarse.

(I)-En la bibliografía relativa a este capítulo me he guiado por las citas del trabajo de Scheffer.-

La proporción de las sustancias obtenidas en fermentaciones realizadas en condiciones aparentemente iguales no es constante, pero un cuadro de resultados de varias experiencias hechas con B. coli, en el cual figura el número de átomos gramo de carbono que aparecen como ácido láctico, ácido succínico, ácido fórmico, ácido acético, alcohol y anhídrido carbónico cuando fermenta un mol de glucosa, lo lleva a la conclusión siguiente: a ácido láctico corresponden 2 a 3 at. gr. de C., a alcohol corresponden 1 at. gr. de C., a ácido acético corresponden 1 at. gr. de C. a anhídrido carbónico corresponden menos de 1 pero mas de 0.5

Relación en volumen  $H_2/CO_2$ .... alrededor de 1.

El B. typhosum difiere del B. coli en un punto: produce ácido fórmico en gran cantidad, que, según Harden, equivale al  $CO_2$  e  $H_2$  que aparecen en el caso de B. coli pues como encontraron Parkes y Jolliman, el B. typhosum no actúa sobre los formatos mientras el B. coli es capaz de descomponer una cantidad considerable de formiato de sodio lo que conduce a admitir que en la fermentación de glucosa los gases provienen muy probablemente de ácido fórmico previamente formado.

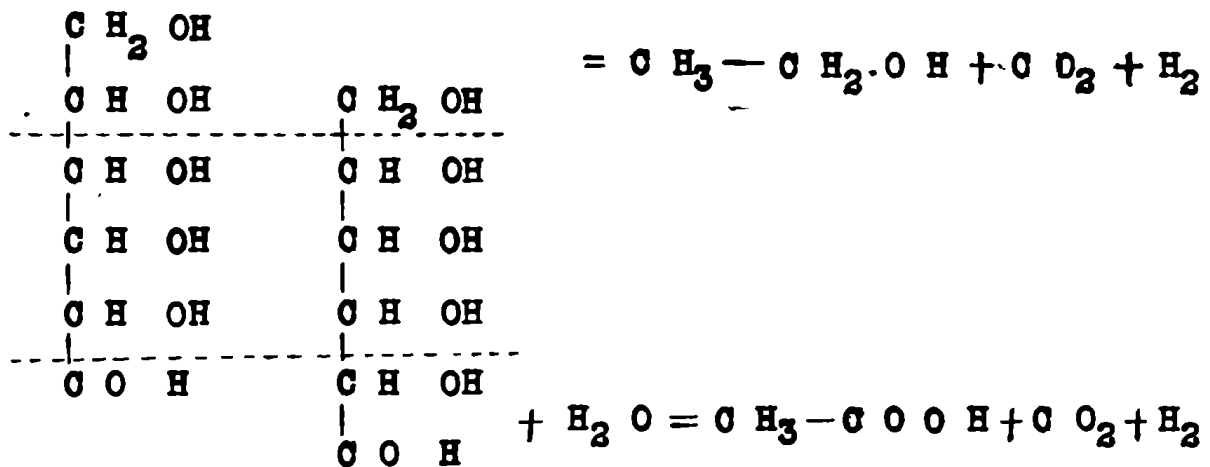
La fermentación de la levulosa por el B. coli es muy semejante a la fermentación de glucosa pero en cambio cuando el sustrato es manita se notan las diferencias siguientes: hay una mayor proporción de alcohol (pasa del 25% en peso de a

la manita fermentada); mayor proporción de gases y ácido succínico y menor de ácido láctico y acético.

Para dar una idea del trabajo de Harden el cuadro Ia( pag. 43 ) resume algunas de sus experiencias. Sus consideraciones teóricas son estas:

Parece que en la fermentación de glucosa y levulosa intervienen por lo menos 2 moléculas, y la reacción principal sería la siguiente:

$2 C_6 H_{12} O_6 + H_2 O = 2 C_3 H_6 O_3 + C_2 H_4 O_2 + C_2 H_6 O + 2 CO_2 + 2 H_2$   
que se puede explicar así:



Los dos grupos  $-C H O H-C H O H-C H O H-$  pueden ser convertidos en ácido láctico por trasposición intramolecular de O e H, o ser transformados parcialmente en otros compuestos entre los cuales figurarían alcohol, ácido acético, ácido succínico o hidrógeno.

Estos cambios secundarios serían la razón de que en algunos casos, mientras al ácido láctico corresponden mucho menos de tres átomos-gramo de carbono, al alcohol y al ácido acético correspon-

CUADRO I

Germen	Subst. ferment	Átomos de C. por molec. de subs. ferment. corresp. a:					Átomos de Hidrog
		AC. lactico	Ao. succinico	Ao. acético	Alcohol	Ac. formico Anh. carbonico	
B. coli.....	glucosa	2,71	0,35	0,84	0,70	0,53 (CO <sub>2</sub> )	1,29
B. coli.....	glucosa	1,91	0,32	1,13	1,01	0,74 (CO <sub>2</sub> )	1,77
B. typhosum..	glucosa	2,96	vestig.	0,76	0,70	0,69 (H. COOH)	---
B. coli.....	levulosa	2,89	0,37,	0,97	0,90	0,53 (CO <sub>2</sub> )	---
B. coli.....	manita	1,51	0,58	0,50	2,65	0,02 (H. COOH) + 1,26 (CO <sub>2</sub> )	2,7

den mas de uno, por cada molécula de hidrato de carbono.

En el caso de la manita es interesante que la presencia de dos  $\text{C H}_2 \cdot \text{O H} - \text{O H} \cdot \text{O H} -$  dé lugar a un aumento considerable de la producción de alcohol, lo que se podría explicar con un esquema igual al anterior, suponiendo que aquí los grupos  $-\text{O H} \cdot \text{O H} - \text{O H} \cdot \text{O H} - \text{C H} \cdot \text{O H} -$  dan menos cantidad de ácido láctico y mayor cantidad de otros productos.

En 1905 (16) (1) el mismo autor estudiando la acción química sobre la glucosa de gérmenes aislados de heces que fermentan la lactosa encuentra que el B. lactis aerogenes produce mucho menor cantidad de ácido acético que de alcohol. Como ya se habia observado que el gas desprendido en el caso del B. lactis aerogenes tiene mayor proporción de anhídrido carbónico, Harden y Walpole en 1906 (20) hacen un examen detallado de los productos de fermentación de la glucosa por este organismo, la que parece ser de tipo diferente a la efectuada por el B. coli, y llegan a lo siguiente: se producen todas las sustancias encontradas en el caso del B. coli pero ellas solo representan 2/3 del carbono de la glucosa fermentada.

En cuanto a las proporciones (en el cuadro II (pag. 45) solo figuran dos de los tres análisis efectuados por Harden y Walpole) observan que el B. lactis aerogenes produce mas alcohol que el B. coli, que la relación  $\text{H}_2/\text{CO}_2$  en volumen es mucho menor que 1 y que es a expensas de aquella parte de la molécula que el B. coli transforma en ácido láctico y acético, que el B.

(1) de Harden y Walpole (20)

lactis aerogenes forma nuevos productos.

Cuadro II

GERMEN	Átomos de C. correspondientes a: (por molécula de glucosa)						Hidrógeno (átomos por molécula de gluc.)
	Acido Láctico	Acido acético	Acido fórmico	Acido Succínico	Alcohol	Anhidrido Carbonico	
<i>B. coli</i>	1.91	1.13	0.00	0.32	1.01	0.74	1.77
<i>B. lactis aerogenes</i>	0.55	0.52	0.07	0.27	1.43	1.44	1.5
<i>B. lactis aerogenes</i>	0.33	0.31	0.04	0.15	1.34	1.60	1.33

Del análisis del medio fermentado (con el método que describen) obtienen una sustancia con 52,8% de carbono y calculando la cantidad perdida durante el proceso de extracción, encuentran que representa algo más del Carbono de la glucosa no recuperado en los otros productos.

Un estudio de la naturaleza de esta nueva sustancia les revela que tiene una gran cantidad de 2-3 butilenoglicol que, dada la proporción en que se forma, lo consideran proveniente de la glucosa, si bien la explicación de su modo de formación la postergan hasta tanto se haga un estudio más completo de este producto que denominan "glicol crudo".

Dichos autores encuentran también que el destilado del líquido de fermentación tiene propiedades que señalan la presencia de acetilmetilcarbinol en pequeña cantidad, el cual había sido descubierto por Grimbert y por Desmots en los productos de fermentación de glucosa por varias bacterias.

Harden (17) en un trabajo posterior del mismo año, trata el destilado que tiene acetilmetilcarbinol y el glicol con



solución de O H.K y agua de peptona y llega a la conclusión de que la reacción de Voges - Proskauer (cultivo de 4 días en agua de peptona glucosada + O H.K  $\rightarrow$  color rojo), considerada característica del B. lactis aerogenes, B. capsulatus y B. cloacae, es debida al acetilmetilcarbinol, que en presencia de OH.K y aire se oxida a diacetilo el cual reacciona con algun componente del agua de peptona de naturaleza aun no determinada.

Walpole en 1911 (40) estudiando detenidamente el glicol crudo, propiedades físicas, composición centesimal, peso molecular, productos de oxidación y otros derivados, comprueba que es 2-3 butilenoglicol casi puro con muy pequeñas cantidades de otros glicoles de naturaleza desconocida.

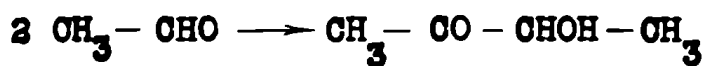
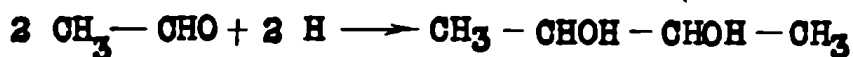
La fermentación de la fructosa por el B. lactis aerogenes, estudiada por Walpole, resulta ser semejante a la fermentación de glucosa.

Thompson en 1912 (43) estudia, con los métodos de Harden, la acción química sobre la glucosa y manita del B. cloacae germen Voges - Proskauer positivo estrechamente relacionado con el B. lactis aerogenes.

En el caso de la glucosa encuentra las mismas sustancias, y proporciones que difieren poco de las de este ultimo y cuando el substrato es manita, el B. cloacae como el B. coli y el B. lactis aerogenes produce una cantidad mayor de alcohol lo que confirmaria la sugestión de Harden ya citada.

Tratando de penetrar en el quimismo de la formación de 2-3 butilenoglicol y acetilmetilcarbinol, Harden y Norris en 1912 (18), investigan la producción de estas sustancias, por varios gérmenes a partir de distintos hidratos de carbono y compuestos mas sencillos como ser glicerina etilenoglicol, etc., siendo esto ultimo de gran interés pues significaría una unión entre átomos de carbono.

Relacionando con el caso de las fermentaciones butílica y butírica, estudiado anteriormente por otros autores, en las cuales se admite una previa formación de acetaldehida que sufre luego una condensación aldólica seguida por una reducción con o sin oxidación posterior, dichos autores suponen que es muy posible que la formación de acetilmetilcarbinol y 2-3 butilenoglicol sea debida a un proceso semejante que se podría expresar asi:



Sus experiencias para probar esta hipótesis demuestran que se produce 2-3 butilenoglicol a partir de acetaldehida aun cuando no les permiten explicar el mecanismo del proceso.

En conclusión ellos admiten que en la fermentación de glucosa el glicol se produce de acetaldehida previamente formada.

Harden y Penfold en 1912 (19), estudian la acción química sobre la glucosa de una variedad de B. coli communis, incapaz de producir gas en agua de peptona con glucosa en un tubo

de campanita de Durham, obtenida por Penfold mediante cultivo en presencia de cloroacetato de sodio, método de selección al cual resiste el B. lactis aerogenes.

Los resultados que dan como preliminares son los siguientes:

GERMEN	Átomos de C. por molecula de glucosa Fermentada correspond a:						Hidrogeno (cc. por gr. de azúcar)
	Acido láctico	Acido acético	Acido fórmico	Acido succínico	Alcohol	Anhidrido carbónico	
Cepa original	2.43	1.24	0.10	0.29	1.35	0.7	80.6
Cepa seleccionada	4.66	0.6	0.14	—	0.43	0.08	12.6

Las relaciones entre los productos de fermentación de glucosa de ese organismo seleccionado son completamente incompatibles con la ecuación dada por Harden. La explicación que este autor sugiere es la siguiente: es probable que la acción de los organismos normales sea debido a 3 enzimas que actúan independientemente; una convierte el azúcar en ácido láctico; otra produce alcohol, ácido acético y fórmico y este último es descompuesto por una tercera enzima en anhidrido carbónico e hidrógeno.

Estas enzimas pueden existir en distintas proporciones en los diferentes organismos individuales, y del proceso de selección resultaría que sobrevive un organismo que tiene una gran proporción de la enzima que produce ácido láctico y una pequeña proporción de la que produce alcohol, ácido acético y fórmico pero que retiene el poder de descomponer ácido fórmico.

Si posteriores experiencias concordaran con estas y la precedente explicación fuera correcta, dicen Harden y Penfold el estudio de la acción química de estos organismos seleccionados constituiría un medio de investigación de valor en la naturaleza de los varios procesos de fermentación efectuados por bacterias.

Mas tarde, en 1914, Grey (41) hace una serie de determinaciones cuantitativas de los productos de fermentación de glucosa y manita por cepas normales y seleccionadas en agar-oro acetato de B. coli communis esperando poder determinar así, por comparación de los resultados, cuantas enzimas diferentes intervienen en el proceso.

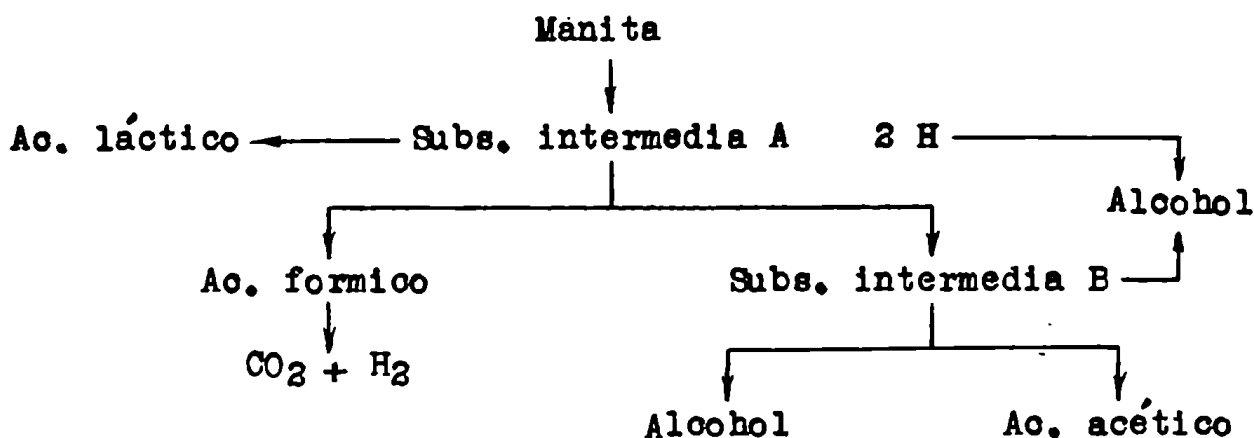
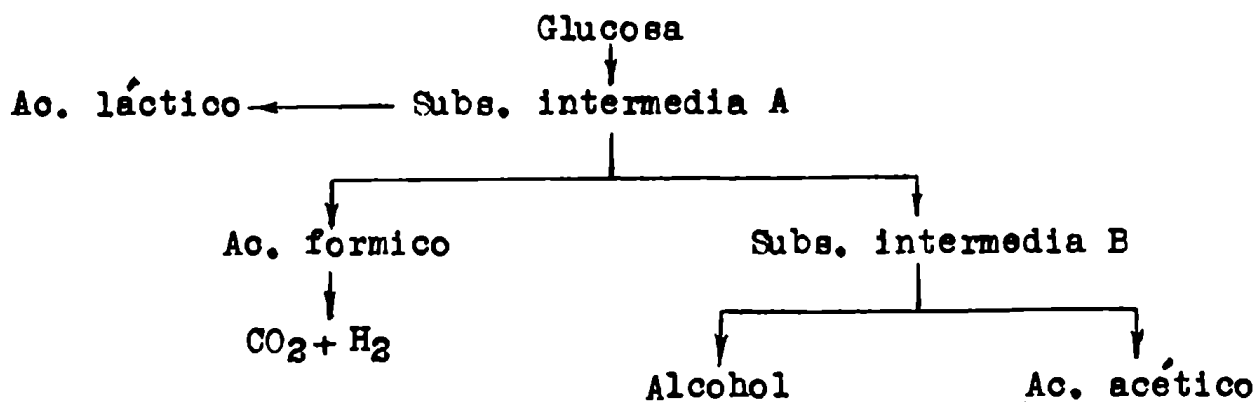
Si una enzima interviene en la formación de una serie de productos, dice Grey aclarando lo expuesto por Harden y Penfold, la relación que estos mantienen entre si no será modificada por el método de selección, ó, inversamente, si por la selección se altera la relación se puede decir que no son producidos por una enzima a menos que esas dos substancias se puedan reemplazar entre si, debido a reacciones secundarias.

En los resultados Grey observa que las cepas seleccionadas difieren considerablemente de las normales en su acción sobre la glucosa, mientras en la fermentación de manita la única variación importante es la no descomposición en un caso, y solo parcial descomposición en otro, del ácido fórmico en anhídrido carbónico e hidrógeno.

Calculando el número de átomos gramo de carbono que corresponde a alcohol, ácido acético, ácido fórmico y anhídrido carbónico, para cada mol de manita fermentada, <sup>h</sup>relación  $\frac{\text{ácido acético} + \text{alcohol}}{2(\text{ác. fórmico} + \text{CO}_2)}$ , donde figuran dichos valores, es prácticamente constante igual a la unidad, y esto lo lleva a concluir que el alcohol y el ácido acético son probablemente derivados de una substancia intermedia común a ambos, substancia que se forma en relación constante con el ácido fórmico.

El ácido láctico, según Grey, se podría considerar formado directamente de la manita por una enzima especial, si la cantidad de hidrógeno desprendido fuera mayor que la de anhídrido carbónico, o si el alcohol y el ácido fórmico fueran producidos por la misma enzima que el ácido láctico de acuerdo a una ecuación que podría ser la siguiente:  $\text{C}_6 \text{H}_{14} \text{O}_6 \neq \text{C}_3 \text{H}_6 \text{O}_3 + \text{C}_2 \text{H}_5 \cdot \text{OH} + \text{H} - \text{CO} \cdot \text{OH}$ . y de ocurrir esto último, como la proporción de ácido láctico actualmente producida es solo 1/3 de la requerida por la ecuación, habría que buscar otro origen para el alcohol y el fórmico.

Grey da los siguientes esquemas de fermentación de glucosa y de manita por el B. coli communis que representan un progreso importante en los estudios de fermentación de hidratos de carbono:



Grey supone que la sustancia intermedia A, aun desconocida, esta relacionada, muy probablemente, con la aldehida pirúvica y que la sustancia intermedia B es acetaldehida. Esto último esta apoyado por la evidencia de que la acetaldehida puede ser encontrada entre los productos de descomposición de glucosa por el B. coli communis (Grey 1913).

Dos moléculas de acetaldehida, por la reacción de Cannizzaro, pueden producir una de alcohol y una de ácido acético.

Siendo este el origen principal de dichas sustancias en el caso de la glucosa se explicaria el que aparecieran en proporciones aproximadamente equimoleculares.

Pero además, la acetaldéhidida puede ser reducida como fue postulado por Kostytscheff para la fermentación alcohólica por la levadura.

En el caso de la manita, esta reducción podría ser de importancia, interviniendo los átomos de hidrógeno que quedan en libertad al formarse la sustancia intermedia A, los que pueden reducir una parte considerable de B, siguiendo el resto de esa sustancia intermedia el mismo camino que en la glucosa.

Así se explicaría el exceso de alcohol sobre ácido acético en la fermentación de manita. Además, la reacción por la cual la sustancia intermedia A da ácido fórmico y sustancia B, se efectúa más rápidamente con la manita que con la glucosa; de ahí que se forme menos ácido láctico en el primer caso que en el segundo. Esta aceleración de la reacción, en el caso de la manita puede ser debida a que al reducirse la sustancia B a alcohol por el hidrógeno, es quitada de la esfera de descomposición de A.

La esencial diferencia entre los dos procesos de fermentación residiría en la necesidad de la cooperación, en el caso de la glucosa, de una reductasa, la aldehído mutasa de Cannizzaro, que no es igualmente requerida en el caso de la manita.

Si como resultado de la selección en agar-cloro-acetato se obtuvieran gérmenes con poca reductasa, se debe esperar, de acuerdo con lo expresado, que en la fermentación de glucosa por dichos gérmenes haya una sustracción menor de B de la esfera de descomposición de A, lo cual conduce a la mayor producción de ácido láctico, y que, por otro lado, la fermentación de manita no difiera prácticamente de la del germen normal. Y esto es lo que se observa en las experiencias. Por otra parte, no llamaría la atención que este método de selección condujera a gérmenes pobres en reductasa, porque los organismos capaces de efectuar reducción intensa, probablemente convertirían al ácido monocloro-acético en ácido acético dejando en libertad ácido clorhídrico lo cual no sería ventajoso para el organismo.

Estas son, en pocas palabras las consideraciones que Grey hace en la primera parte de su trabajo sobre las enzimas que intervienen en la fermentación de glucosa y manita por el B. coli communis que efectuó entre 1914 y 1921.

He tratado con especial interés este trabajo porque Grey da aquí una explicación bastante clara del origen de la mayor parte de los productos de fermentación de glucosa por el B. coli, y su esquema representa una parte del esquema dado por Kluyver que es, indudablemente, muy aproximado, como lo demuestran los balances de fermentación realizados por Scheffer, que mas adelante trataré.



Esta primera interpretación de Grey, si bien interesante, no es completa puesto que no explica el origen de uno de los productos de fermentación: el ácido succínico.

A esto se refiere dicho autor en las comunicaciones posteriores (12) donde trata de demostrar que, variando las condiciones en las cuales se realizan las experiencias es posible alterar la proporción entre los productos de fermentación, constituyendo el estudio detenido de estas variaciones un camino hacia la explicación del mecanismo del proceso.

Comienza por modificar la técnica seguida hasta entonces, que consistía en hacer una siembra de los gérmenes en estudio, en agua de peptona con glucosa, en ambiente de nitrógeno y dejar fermentar durante 3 o 4 semanas a 37°. Usa en cambio una suspensión abundante de gérmenes en solución de  $\text{SO}_4 \text{K}_2$ , que deja actuar sobre solución de glucosa en agua durante 48 a 68 horas, también en anaerobiosis y a 37°.

Con esto elimina la peptona y separa el proceso de crecimiento del de fermentación, dos objeciones que se podían hacer a su primer trabajo.

De los resultados de varias experiencias hechas con distintas concentraciones de  $\text{SO}_4 \text{K}_2$ , lo que introduce variaciones apreciables en el porcentaje de cada uno de los productos, saca en conclusión: 1ª) que el proceso se efectúa en dos direcciones principales: formación de ácido láctico por un lado y de los

productos restantes de fermentación por otro; 2°) que el alcohol, ácido acético y ácido succínico tienen origen común pudiendo provenir el ácido succínico de la unión de dos grupos  $-\text{CH}_2 - \text{COOH}$ .

Dice, además, Grey, que las enzimas que efectúan la descomposición de la glucosa también intervienen en la descomposición de la manita y que, con respecto a la fermentación bacteriana en general, los resultados experimentales señalan la independencia de las enzimas celulares.

Si estas enzimas actúan simultáneamente será posible tal vez arreglar las condiciones de modo que solo una permanezca en actividad, y si, por el contrario, actúan consecutivamente, estudiando las transformaciones que tienen lugar en intervalos cortos se podrán separar las varias fases. Teniendo en cuenta esto Grey, hace una experiencia con un dispositivo que le permite sacar muestras, del líquido en fermentación y gases desprendidos, a distintas horas de iniciado el proceso determinando además el número de gérmenes vivos en el comienzo de cada período con el objeto de saber hasta que punto la fermentación es debida a la acción enzimática independiente de la multiplicación de las células. De este modo demuestra que la fermentación se efectúa en varias fases que están muy relacionadas con el aumento y disminución del número de células vivas. Esta experiencia señala también la independencia de la formación de ácido láctico, pero, además, en una de las fases, que es de multiplicación activa, Grey no encuentra en los productos analizados el total de la glucosa desaparecida por lo

cual: habla de la posible síntesis de un hidrato de carbono no reductor mas complejo que la glucosa el cual inmediatamente se degradaría en ácido láctico.

Aun cuando la separación de las fases no es absoluta, ya sea desde el punto de vista de la ausencia completa de células vivas o de la transformación total del sustrato en una sola dirección, dice Grey, estos resultados conjuntamente con otros anteriores (Harden y Penfold y Grey) no dan casi lugar a duda de que los varios procesos de fermentación por los cuales el B. coli communis lleva a cabo la descomposición de la glucosa son verdaderas acciones enzimáticas que pueden tener lugar independientemente.

Por las experiencias de su II y III comunicaciones Grey admite que la glucosa se transforma por acción de B. coli según dos direcciones principales. Mas tarde, los resultados de una serie de fermentaciones de dicho azucar en presencia de formiato de calcio lo llevan a modificar su opinión: La glucosa se rompe por influencia del B. coli en tres grupos principales de productos

- 1º Acido fórmico, anhídrido carbónico e hidrógeno.
- 2º Acido acético, alcohol ácido succínico.
- 3º Acido láctico.

El hidrógeno nascente del grupo I es capaz de reducir la acetaldehida a alcohol de modo que la formación de los

productos de los dos primeros grupos esta muy relacionada, mientras la 3<sup>a</sup> reacción, no siendo influenciada por la cooperación del hidrógeno sigue un camino independiente al de las otras dos.

Con respecto a la estrecha relación entre el ácido acético y el ácido succínico, que señalara anteriormente, Grey considera aquí que, del punto de vista de la intercambiabilidad de estos dos productos el hidrógeno utilizable es un factor decisivo: si no hay tal hidrógeno se forma ácido succínico; de lo contrario aparece acético y con cantidades mayores del agente reductor, alcohol.

Esta íntima relación entre los grupos I y II explicaría porque tienden a aparecer como constituyendo uno solo.

Posteriormente Grey y Young<sup>(13)</sup> comparando los resultados de fermentaciones anaerobias de glucosa después de crecimiento anaerobio con los obtenidos después de crecimiento aerobio y considerando los efectos que produce la introducción de oxígeno durante la fermentación, señalan, confirmando lo anterior, la existencia de tres líneas principales de descomposición en productos de 1, 2 y 3 átomos de carbono que están representados por ácido fórmico (que se descompone en anhídrido carbónico e hidrógeno), ácido acético y alcohol, y por último láctico pudiendo haber además una interacción del hidrógeno naciente del grupo I con las sustancias del grupo II que modifique la proporción alcohol - ácido acético y reacciones secundarias que den origen al ácido succínico cuya estrecha relación con el ácido acético hacen notar nueva-

mente en estos resultados. En cuanto al mecanismo por el cual se originan el alcohol y el ácido acético Grey y Young, después de estas experiencias, vuelven a pensar en la reacción de Cannizzaro.

En 1924 (14) Grey publica un trabajo sobre "los poderes fermentativos latentes de las bacterias" donde estudia la acción del B. coli communis sobre glicerina, glicol, ácido málico, málico, tartárico, cítrico y succínico en presencia de formiatos.

Los datos acumulados en estas experiencias unidos a lo visto ya en las anteriores comunicaciones, le sugieren una "teoría simple de la fermentación". No puede haber un ejército de enzimas esencialmente diferentes, dice Grey. Sólo unas pocas son responsables de la descomposición bacteriana de cualquier sustancia fermentable y unas pocas enzimas comunes a todas las bacterias bastan para explicar los procesos de fermentación. Podrían imaginarse cinco en varias combinaciones para provocar la degradación de sustancias tales como hidratos de carbono.

- 1°. Una enzima que separe el H. con ayuda de aceptores.
- 2°. " " " " " O. " " " acep. oxidables.
- 3°. " " " " " grupos de 1 átomo de C.
- 4°. " " " " " " 2 átomos de C.
- 5°. " " " " " " 3 " " " ".

En la mayoría de las fermentaciones intervienen

otros mecanismos secundarios como ser la división del ácido fórmico en  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2$  aunque esto puede ser una modificación de la acción combinada de las enzimas 1 y 3. Además las enzimas 3, 4 y 5 pueden ser transformadas una en otra o de algún modo son de origen común.

Grey hace notar que, lejos de contradecirlas, esta teoría incluye a las anteriores admitiendo que la formación de un compuesto intermedio de tres átomos de C., generalmente aceptada, es solo una de las posibles líneas de ruptura de la exosa aunque no puede negarse que es la más común, y que la capacidad de un organismo para romper la molécula de azúcar en un punto cualquiera puede estar latente requiriéndose condiciones especiales para que sea puesta en evidencia.

Grey llega a esta teoría completamente general pero en lo que se refiere al mecanismo de la fermentación de la glucosa por el E. coli communis, aunque hace una serie de observaciones muy interesantes, no nos da un esquema completo representativo del proceso que pueda ser controlado con determinaciones cuantitativas que es sin duda una de las mejores maneras de ensayar la probabilidad de una hipótesis.

La existencia de acetaldehida como producto intermedio en estos procesos de fermentación es admitida en general. Ahora bien, pretender comprobar mediante análisis directo que tal o cual sustancia es en realidad un intermedio entre el sustrato y los productos finales, es casi pretender lo imposible dada la

velocidad que caracteriza a tales procesos de fermentación. A Neuberg y a sus colaboradores se debe un método de trabajo que permite demostrar la probabilidad de la existencia de determinadas sustancias en un proceso de intercambio dado. Es el conocido "método de captación" que en principio consiste en agregar al medio a fermentar una sustancia que reaccionando con la que, según se supone, aparece como intermedia, impide su ulterior descomposición. De este modo Neuberg y Nord en 1919 (30) demuestran que en la descomposición de los hidratos de carbono y sustancias afines como glicerina y manita por el B. coli communis, aparece acetaldehida en cantidades considerables cuando la presencia de sales del ácido sulfuroso, con las cuales reacciona, permite su acumulación.

Teniendo en cuenta esta observación Neuberg, Nord y Wolf en 1920 (31) investigan la presencia de acetaldehida como escala intermedia en la fermentación de glucosa por el B. lactis aerogenes, por estar este germen estrechamente relacionado con el B. coli.

Usando  $\text{SO}_3 \text{Na}_2$  como medio de fijación encuentran el 5% del azúcar fermentada como acetaldehida mientras los controles sin sulfito no dan ni siquiera vestigios. Determinaciones cuantitativas de los derivados butílicos (acetilmetilcarbinol y 2-3 butilenoglicol) que Harden y Walpole descubrieron como productos de fermentación de glucosa por el B. lactis aerogenes, muestran

que estas sustancias aparecen en cantidades mucho menores en presencia de  $\text{SO}_3 \text{Na}_2$  que en los controles (aun aquí hay menor porcentaje que el indicado por los autores ingleses lo que podría deberse a la variedad de gérmenes) lo que confirma la opinión de Harden y Norris ya citada.

Este método de Neuberg para la investigación de productos intermedios ha permitido llegar a conclusiones interesantes pero solo probables porque tiene el inconveniente que señala Kluyver: "es perfectamente concebible que el producto que se fija por el compuesto añadido no~~x~~forme en condiciones normales sino que deba su origen a la presencia del compuesto de fijación en el medio. La probabilidad de que una sustancia encontrada con este método pueda considerarse como un intermedio normal es mucho mayor si se logra encontrar trazas de dicha sustancia en fermentaciones normales".

En 1924 Donker (8) (1) hace una comunicación sobre "El quimismo de la fermentación de glucosa por gérmenes del grupo Coli", donde opina que el esquema dado por Grey en 1914 (11) puede explicar satisfactoriamente el proceso de fermentación del B. coli y del B. lactis aerogenes cuyas diferencias principales residirían en lo siguiente: 1º. El B. coli transforma la mayor parte del acetaldehida de acuerdo a la reacción de Cannizzaro mientras el B. aerogenes forma a partir de dichas sustancia intermedia una cantidad considerable de acetilmetilcarbinol. 2º. En el caso de B. coli casi todo el hidrógeno que resulta de la descomposición

(1) de Scheffer (33).



del ácido fórmico se desprende como gas no ocurriendo lo mismo con el E. aerogenes que utiliza una buena parte como agente reductor del acetaldehida y acetilmetilcarbinol con producción de alcohol y 2-3 Butilenoglicol respectivamente.

Como confirmación de su teoría Donker encuentra que de acuerdo con los resultados de las determinaciones cuantitativas de los productos de fermentación y teniendo en cuenta lo dicho sobre el destino del hidrógeno se llega en ambos casos a una relación  $\frac{H_2}{CO_2} \pm = 1$ .

Respecto a esta teoría Scheffer en su tesis hace notar que, en lo referente al E. coli Donker se ha guiado por una experiencia de Harden (15) en la que no se formó ácido succínico, sin tener en cuenta los balances posteriores de Grey que señalan cantidades apreciables de dicho ácido.

Mas tarde Kluyver y Donker (22) (1) considerando el ácido succínico como producto de fermentación del E. coli admiten la opinión de Grey: sobre su origen sin hacer comprobaciones cuantitativas de tal posible formación. En 1925 aparece un estudio de de Graaff y Le Fèbre<sup>(2)</sup> sobre la fermentación de varias sustancias por gérmenes del grupo Coli-tiphus.

Al ensayar una serie de azúcares y alcoholes encuentran que siempre que hay formación de ácido se puede comprobar la presencia de acetaldehida con el método de captación.

Recordando la hipótesis de Neuberg para la fermentación

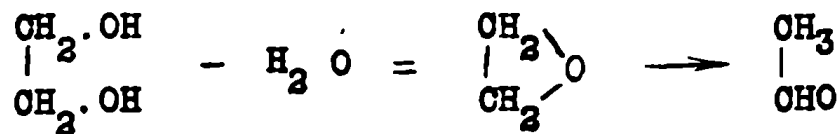
(1) de Scheffer (33)

tación alcoholica de la glucosa por la levadura según la cual el hidrato de metilglioxal es uno de los intermedios mas importantes que se transforma, con desprendimiento de hidrógeno en ácido piruvico el cual a su vez es la sustancia madre de acetaldehida y anhídrido carbónico, suponen que tal vez se la pueda aplicar al caso de los gérmenes del grupo coli-tiphus y de acuerdo con esto observan que el ácido pirúvico es fácilmente fermentable por tales bacterias con formación de acetaldehida. Por otra parte el hidrato de metilglioxal, que es su antecesor hipotetico, no es aparentemente atacado, lo que sin embargo no consideran argumento poderoso en contra de esa teoria pues, como lo hizo notar Neuberg, para un organismo es diferente actuar sobre una sustancia agregada o formada en el medio y mas aún en el caso del hidrato de metilglioxal que puede presentarse en varias formas isómeras. Podria ocurrir, efectivamente, que la obtenida en el laboratorio fuera una forma estable sobre la cual el germen no puede actuar con la misma facilidad con que actúa sobre los isómeros lábiles que aparecen durante el proceso de fermentación.

de Graaff y Le Fèbre consideran que un buen camino para llegar a explicar la descomposición de una exosa por una bacteria, es ir estudiando su acción sobre compuestos mas sencillos, es decir cadenas de 2,3,4...átomos de carbono y es por eso que hacen un análisis de los productos de fermentación por el B. coli de glicol, glicerina, aldehida glicérica, ácido glicérico, dioxiac-

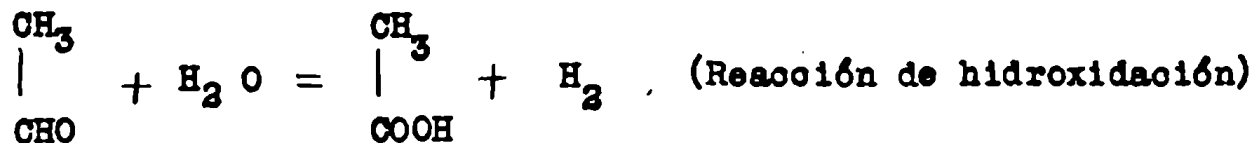
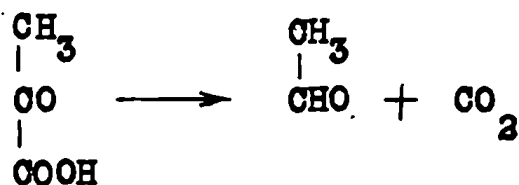
tona y ácido pirúvico.

En el caso del glicol encuentran acetaldehida y ácido acético cuya formación explican así:



la acetaldehida se oxidaría con el oxígeno del aire puesto que en fermentaciones anaerobias no encuentran acético.

En los otros casos aparecen siempre los mismos productos principales: ácido acético, anhídrido carbónico e hidrógeno; de Graaff y Le Fébre admiten lo siguiente:



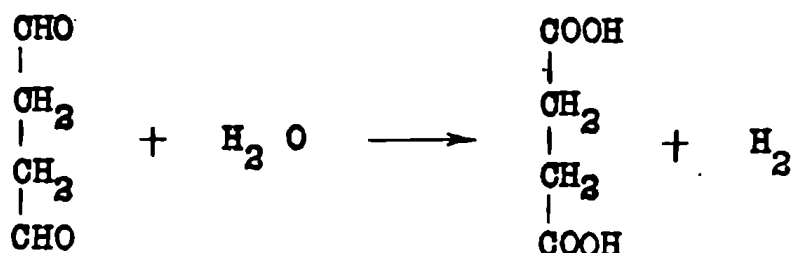
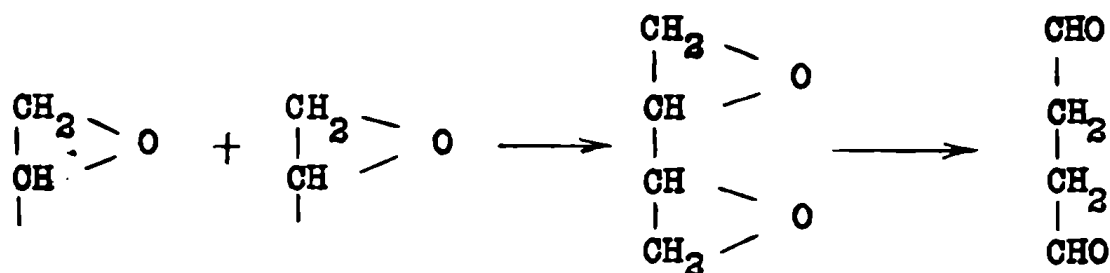
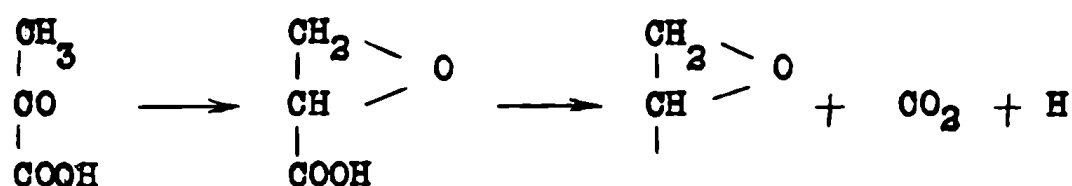
Dioxiacetona, aldehida glicérica, ácido glicérico y glicerina se transforman por medio de reacciones de deshidratación, trasposición intramolecular (semejantes a las señaladas para el glicol) e hidroxidación, según un mecanismo que sugieren para cada caso, en ácido pirúvico que luego sigue el camino indicado.

Cuando el sustrato es glicerina aparecen como productos finales ácido láctico y ácido succínico, por lo cual dichos autores consideran que este proceso de fermentación es enteramen-

te comparable al de los azucares si bien la cantidad de ácido láctico es mucho menor y no hay producción de ácido fórmico.

El ácido láctico se puede originar por trasposición intramolecular del hidrato de metilglioxal pero en el caso de la glicerina admiten que hay una deshidratación entre los carbonos 1 y 3 seguida de trasposición intramolecular con formación de aldehida láctica que luego sufre hidroxidación.

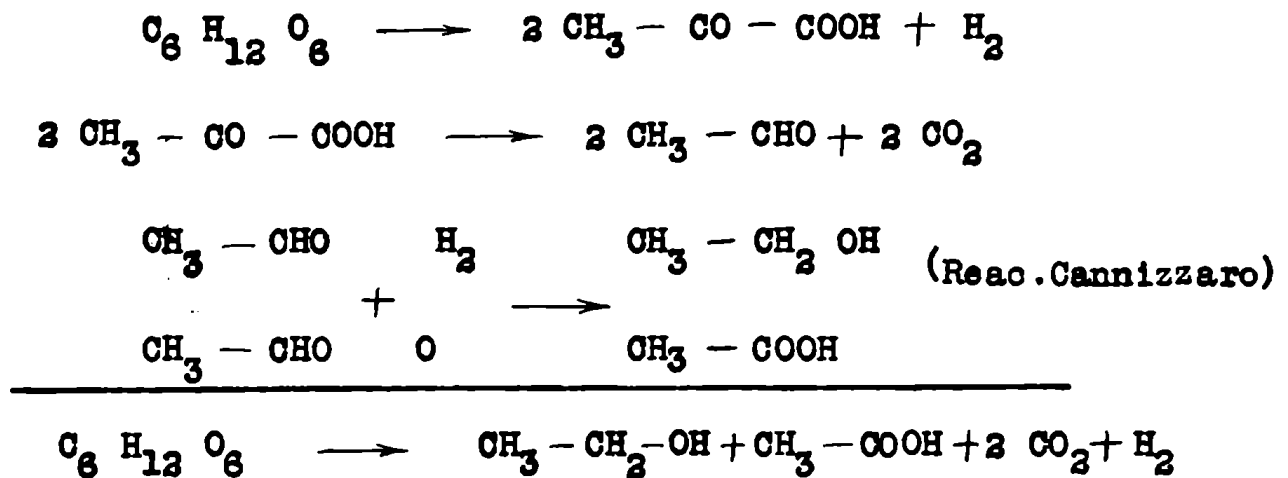
En cuanto al ácido succínico suponen que se origina por condensación de dos grupos  $\begin{array}{c} \text{CH}_2 \\ | \\ \text{CH} \end{array} \begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{O}$  que provienen de moléculas de ácido pirúvico que han sufrido una trasposición semejante a la indicada para el glicol. El esquema es el siguiente:



Naturalmente que, como hacen notar los autores, no se puede contestar porque no se forma en otros casos el ácido succínico.

de Graaff y Le Fébre explican el mecanismo de la descomposición de la glucosa por el B. coli según un esquema diferente a los anteriores pero tampoco hacen comprobación de su teoría considerando la relación entre las cantidades que se forman de los distintos productos finales.

En 1925 Aubel y Salabartan (1) habiendo encontrado ácido pirúvico en cantidades apreciables en una fermentación de glucosa por el B. coli y teniendo en cuenta los estudios de Neuberg y Nord ( ) suponen que la descomposición se efectúa así:



y se basan sobre todo en los resultados de las determinaciones cuantitativas que consideran bastante concordantes con los valores calculados sobre esta ecuación de acuerdo a la cantidad encontrada de ácido acético y sin olvidar al hidrógeno correspondiente al ácido pirúvico no descompuesto. Sin embargo esta concordancia

no es muy satisfactoria sobre todo en una experiencia en que no aparece ácido pirúvico entre los productos finales. Como además de sufrir esta degradación, la glucosa se transforma en ácido láctico, Aubel y Salabartan (2) tratan de establecer que relación existe entre los dos procesos y de acuerdo con los resultados de fermentación de piruvato y lactato llegan a la conclusión de que son independientes.

En cuanto al origen del ácido fórmico y del ácido succínico que los investigadores anteriores encontraron entre los productos de descomposición de glucosa por el B. coli, Aubel y Salabartan no dan ninguna explicación.

En 1926 Kluyver y Donker<sup>(23)(4)</sup> teniendo en cuenta los resultados de Grey y las observaciones de Virtanen sobre la formación de ácido succínico en la fermentación propionica por ruptura de la molécula de glucosa en 2 partes, una con cuatro átomos de C y otra con dos, modifican su opinión referente al origen de dicho ácido en la fermentación del mismo azúcar por el B. coli considerando que en este caso se produce una descomposición del mismo tipo.

Es universalmente aceptado que en los procesos de fermentación la glucosa se divide en primer término en dos moléculas de tres átomos de carbono que muy probablemente son hidrato de metilglicoxal. Kluyver y Struick explican el mecanismo de esta transformación con el esquema que figura en la página. 38

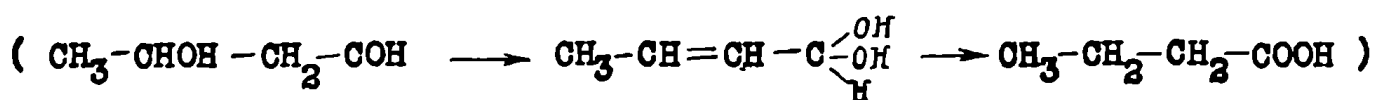
Estas consideraciones, como dice el autor<sup>2</sup>, son de  
(1) de Schaffer (33)



caracter altamente especulativo pero permiten explicar todas las observaciones importantes hechas en el laboratorio".

Ya en 1905 Harden y Young (44) (1) habian señalado la formación de un ester bifosfórico de la glucosa como una reacción importante en el proceso de la fermentación alcoholica, pero, de acuerdo con sus experiencias Kluyver y Struick consideran que se trata de un ester monofosfórico aunque tambien segun las condiciones se puede formar un ester bifosfórico.

Virtanen en su estudio sobre la fermentación propiónica admite que el ácido succínico se forma de glucosa no fosforada y aun cuando sus conclusiones no se tienen muy en cuenta, segun Scheffer, después de las investigaciones de van Niel, esta no deja de ser una observación interesante, que, por otra parte, es aceptada por la escuela de Kluyver. Asi como se supone que en el ester monofosfórico, tal vez por influencia del grupo pesado, el H del carbono 4 pasa al carbono 3 y se rompe la molécula en dos cuerpos de tipo  $C_3$ , se puede pensar, segun Kluyver, que en la molécula de glucosa no fosforada el cambio se produce de tal manera que un H del carbono 4 pasa al carbono 5 formandose glicol y dialdehida del ácido tartárico que se transforma en succínico de la manera indicada para el  $CH_3-CHOH-CH_2-CHO$  en la fermentación butírica.



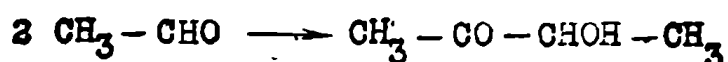
En 1926 de Graaff( ) ( ) a raiz de unos estudios

(1) de Kluyver (21)

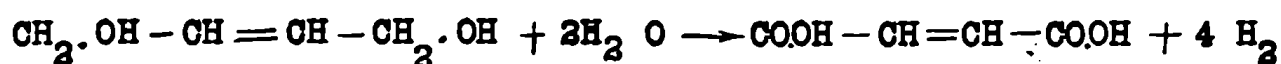
(2) de Scheffer (33)



de Le Febvre hace una serie de observaciones teoricas sobre la fermentación de glucosa por el B. coli que no difieren mucho de las anteriores aunque ahora admite la posibilidad de que el ácido succínico se forme del acetilmetilcarbinol así:



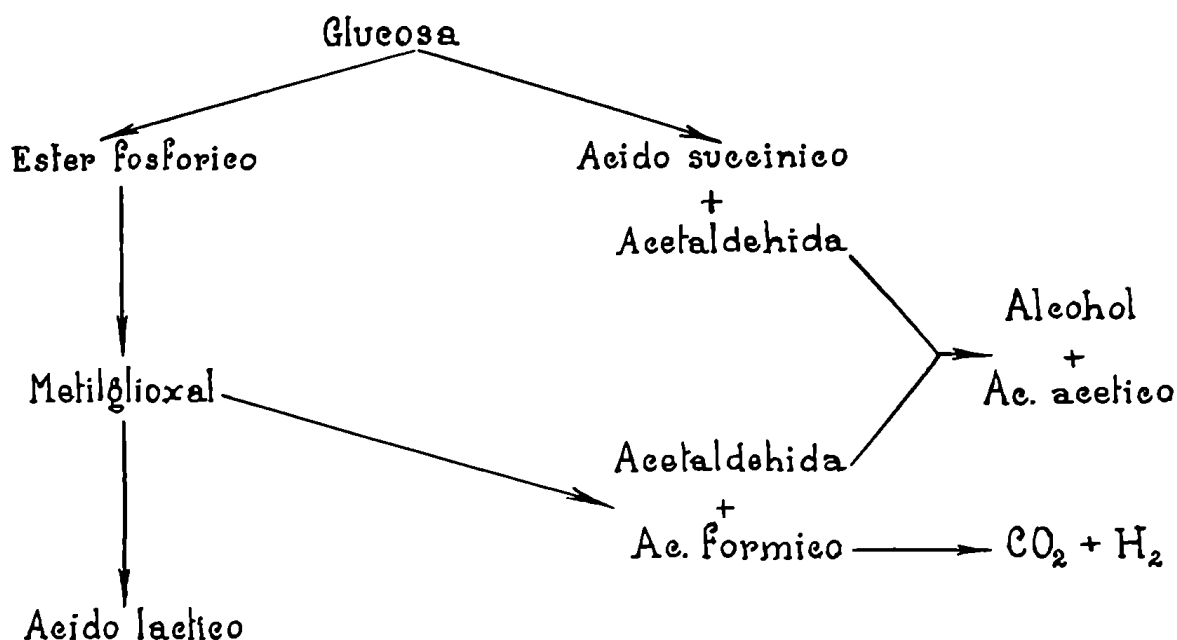
el glicol sufriría una <sup>hidr</sup>oxidación



que por acción del  $\text{H}_2$  se transforma en ácido succínico .

A esta teoria Scheffer en su tesis le hace la seria objeción que nunca ha sido encontrado por otros autores el acetilmetilcarbinol entre los productos de fermentación del B. coli.

En 1927 Virtanen y Simola (39) en Finlandia estudian la fermentación de azúcares por bacterias del grupo coli-aerogenes llegando a la conclusión de que el proceso ,que consideran muy semejante al de fermentación propionica al que se refirieron anteriormente, se puede explicar con el siguiente esquema.



Tampoco Virtanen ha controlado su esquema con determinaciones cuantitativas .

En 1928 Scheffer (33) publica su tesis sobre "La fermentación de azúcar por bacterias del grupo coli" que es sin duda un estudio mucho mas completo que los anteriores sobre ese tema, pero antes de referirme a este trabajo quiero resumir algunas consideraciones generales de Kluver (24) y sus colaboradores sobre los procesos de fermentación .

Todos los investigadores estan de acuerdo en que la glucosa se transforma en los productos finales pasando por una serie de etapas intermedias, pero es un problema difícil establecer cual es el camino de la reacción, dada la imposibilidad, por lo menos actual, de estudiar directamente tales procesos.

Ya he hablado del método de Neuberg y de la objeción que se le hace .Tambien tiene un valor relativo el que una

bacteria sea capaz de transformar o no a la substancia que se supone intermedia, porque, ademas de lo que ya he citado refiriendome a los estudios de de Graaff y Le Fèvre, hay que considerar que la descomposición de un producto determinado puede depender de la existencia simultánea de otros, dada la intima relación que existe entre las varias reacciones parciales, y aun cuando los resultados positivos tienen mucho mas valor que los negativos, el hecho de que una substancia sea transformada por el germen no es una prueba de que se forma en el proceso normal. De modo que en realidad solo tiene importancia la coordinación de todos los hechos observados.

Por otra parte es cada vez mas evidente que las transformaciones primarias que es capaz de efectuar la célula viva, se pueden reproducir in vitro con distintos catalizadores, y por eso será mayor la probabilidad de un esquema en el cual figuren reacciones del mismo tipo que las encontradas en química orgánica.

Kluyver (21) y sus colaboradores llegan a demostrar que todas las transformaciones que tienen lugar en los procesos de fermentación poseen un caracter comun: son del tipo de "transferencia de hidrógeno" inter o intramolecular.

Ademas se comprueba, de acuerdo con las experiencias, que en casos aparentemente muy distintos se producen las mismas reacciones primarias, como por ejemplo, la formación de acetaldehida en la descomposición de glucosa por células de tipo dife-

rente y aunque, también aquí, solo se puede hablar de probabilidades es un hecho que no hay que olvidarlo al considerar un esquema. Basándose en esto es que Kluyver y Donker trataron<sup>de</sup> resumir en un cuadro el conjunto de las reacciones parciales que tendrían lugar en procesos de fermentación de glucosa aparentemente muy distintos.

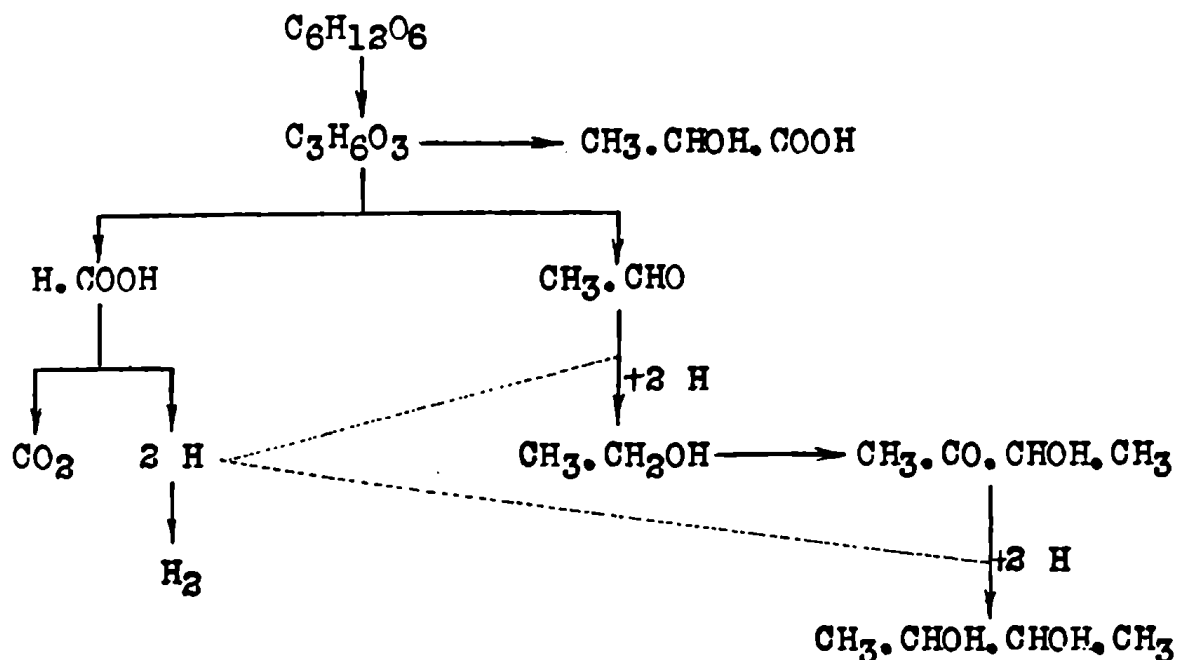
Pero sobre todo hay que tener en cuenta, y esto no lo hicieron la gran mayoría de los investigadores, que las relaciones cuantitativas entre los productos de desasimilación encontradas mediante un análisis cuidadoso del medio fermentado, deben coincidir con las que se esperan de acuerdo con la teoría.

Es indudable que si se trata de explicar el mecanismo de la formación de una sustancia determinada a partir del sustrato se pueden imaginar muchos caminos más o menos probables pero hay que tener presente que, en cada uno de ellos, al lado de esa sustancia se forman otras, lo cual ya limita el número de interpretaciones posibles.

En general (como se observa en la mayoría de los trabajos citados) en las distintas teorías se suponen series de reacciones tales que tanto los productos principales como los secundarios aparecen al final de la fermentación, es decir que del punto de vista cualitativo coinciden dichas teorías con la experiencia, pero se olvidan las exigencias cuantitativas.

Como un ejemplo: supongamos que para explicar la

fermentación de glucosa por el B. cloacae se admita el siguiente esquema en el cual figuran todos los productos de desasimilación encontrados por Scheffer, cuando el germen se desarrolla en agua de levadura con 3% de glucosa.



No basta encontrar en los productos de fermentación el total del carbono de la glucosa fermentada, que es el control que hacen algunos investigadores. Si la representación del proceso corresponde a la realidad, y si los análisis están bien hechos se deben recuperar cuantitativamente los tres elementos del sustrato C. H. y O., comprobándose entre las cantidades de los productos finales las relaciones que prevee la teoría.

Efectivamente de acuerdo con el esquema hay una primera reacción: glucosa  $\longrightarrow 2\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$  según la cual de X moléculas de azúcar forman 2 X moléculas del compuesto de 3 carbonos

Cada uno de estos puede transformarse en ácido láctico o en acetaldehida y ácido fórmico, pero no es necesario que siempre el mismo número de moléculas sigan uno u otro camino. En unos casos se formara mas ácido láctico, en otros mas acetaldehida y ácido fórmico aunque deberá mantenerse la relación:  $n^{\circ}$ . de moléculas de acetaldehida =  $n^{\circ}$ . moleculas de ácido fórmico =  $2 X - n^{\circ}$ . moléculas de ácido láctico. Como ni acetaldehida ni ácido fórmico son productos finales hay que tener en cuenta lo que resultan de las reacciones secundarias.

El ácido fórmico sólo puede transformarse en una dirección dando  $O$   $O_2$  e  $H_2$  (casi nunca lo hace totalmente), pero la acetaldehida, o se reduce con producción de alcohol o por condensación de dos moléculas origina acetilmetilcarbinol, variando según las condiciones en que se realiza la experiencia, la proporción en que aparecen ambas sustancias si bien la suma de las moléculas de alcohol + moléculas de acetilmetilcarbinol por 2 (porque cada una proviene de la unión de 2 moléculas de acetaldehida) sera siempre igual al número de moléculas de acetaldehida que se ha formado en la reacción anterior que como se ha visto es  $2 X - n^{\circ}$ . molec. de ac. láctico. Y si se considera que parte del carbinol se reduce a 2-3 butilenoglicol resulta que, aunque varien las cantidades parciales la suma de 2 veces  $n^{\circ}$ . molec. de acetilmetilcarbinol + 2 veces  $n^{\circ}$ . molec. de 2-3 butilenoglicol +  $n^{\circ}$ . molec. de alcohol +  $n^{\circ}$ . molec. de ácido láctico debe ser constante igual al doble del número de moléculas de glucosa fermentada.

La misma condición es necesaria para la suma :  
 $n^{\circ}$ . mol. de ácido láctico +  $n^{\circ}$ . moles. de ác. fórmico +  $n^{\circ}$ . molec.  
 de anhídrido carbónico. La cantidad de moléculas de  $H_2$  debía ser  
 igual a la de moléculas de  $CO_2$  si el primero no actuara como re-  
 ductor, pero como cada molécula de alcohol y de 2-3 butilenoglicol  
 que se forman utilizan una molécula de  $H_2$  se tendrá que  $n^{\circ}$ . molec.  
 de alcohol  ~~$n^{\circ}$ . molec.~~ +  $n^{\circ}$ . molec. de 2-3 butilenoglicol +  $n^{\circ}$ .  
 molec. de  $H_2$  =  $n^{\circ}$ . molec. de  $CO_2$ . y considerando lo dicho antes  
 también la suma :  $n^{\circ}$ . molec. de ácido láctico +  $n^{\circ}$ . molec. de á-  
 cido fórmico +  $n^{\circ}$ . molec. de 2-3 butilenoglicol +  $n^{\circ}$ . molec. de  
 alcohol +  $n^{\circ}$ . molec. de  $H_2$  debe ser constante e igual al doble  
 del  $n^{\circ}$ . de molec. de glucosa transformada.

Si de acuerdo con los valores que da el análisis  
 se calculan cuantos moles de cada sustancia se hubieran for-  
 mado al fermentar 50 moles de glucosa se deberá cumplir lo si-  
 guiente:

moles de $CO_2$	moles de $H_2$	
moles de ac fórmico	moles de ac fórmico	
+ moles de ac láctico	+ moles de ac láctico	+ moles de ac láctico
	moles de alcohol	moles de alcohol
	moles de 2-3 B. gl.	2 moles de 2-3 Bgl
		2 moles de A.M.C.
100	100	100

Naturalmente que en cada columna la suma no será  
 exactamente 100 puesto que además de los errores propios de los

métodos analíticos hay que considerar que algo del sustrato se transforma en parte integrante de la célula viva .

Si un balance de fermentación hecho de esta manera resulta satisfactorio, es una prueba muy importante a favor del esquema considerado.

Si por el contrario, el balance no cierra, es indudable que el esquema no es exacto o no es completo. En este caso siempre es posible ampliarlo de modo que concuerde con la experiencia, pero muchas veces se deben admitir para esto reacciones suplementarias tales, que el esquema deja de ser probable.

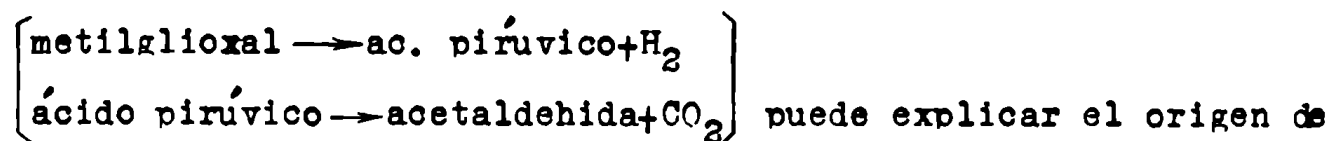
Estas consideraciones bastan para darse cuenta de lo que son los balances de fermentación, que representan una parte principal en los estudios realizados por Kluyver y sus colaboradores, y de la importancia que tienen cuando se trata de explicar el mecanismo de tales procesos.

Veamos ahora a que conclusiones llega Scheffer de acuerdo con los balances de fermentación de glucosa por las bacterias del grupo coli.

En el caso del B. cloacae, admitiendo que el proceso se efectúa como indica el esquema ya citado, el balance resulta satisfactorio, pero según Scheffer "aunque a primera vista no hay inconveniente en aceptar que el hidrato de metilglicoxal se transforma de acuerdo con la reacción 1 b del esquema de Kluyver y Donker (acetaldehida + ácido fórmico), hay que tener presente que también una transformación de tal sustancia según la reacción 1 c de di-



cho esquema



los varios productos finales, siempre que no se tengan en cuenta las cantidades relativamente pequeñas de ácido fórmico.

¿Cuál de las dos teorías esta de acuerdo con la realidad? Scheffer hace una serie de consideraciones que se pueden resumir en lo siguiente:

Como la reacción propuesta por de Graaf,

$\text{H}_2 + \text{CO}_2 \longrightarrow \text{HCOOH}$ , no es probable y tampoco es posible admitir que este ácido se forma a partir del ácido pirúvico según la reacción:  $\text{CH}_3 - \text{CO} - \text{COOH} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{CH}_3 - \text{COOH} + \text{H} - \text{COOH}$  dado que no se encuentran las cantidades correspondientes de ácido acético o de sus productos de descomposición, resulta mas aceptable el esquema del ácido fórmico.

Pero hay una circunstancia que no se puede olvidar, y es que muchas veces se observó que cuando el proceso se efectúa con fuerte aereación, en los productos finales no se encuentra alcohol formandose en cambio igual cantidad de acetilmetilcarbinol y 2-3 butilenoglicol que en condiciones anaerobias. Esto hace suponer que no es igual toda la aldehida formada en las reacciones intermedias, puesto que revela distintas capacidades de oxidación, y si se tiene presente que Kluyver y Donker consideran que para que haya producción de acetilmetil-carbinol es necesario

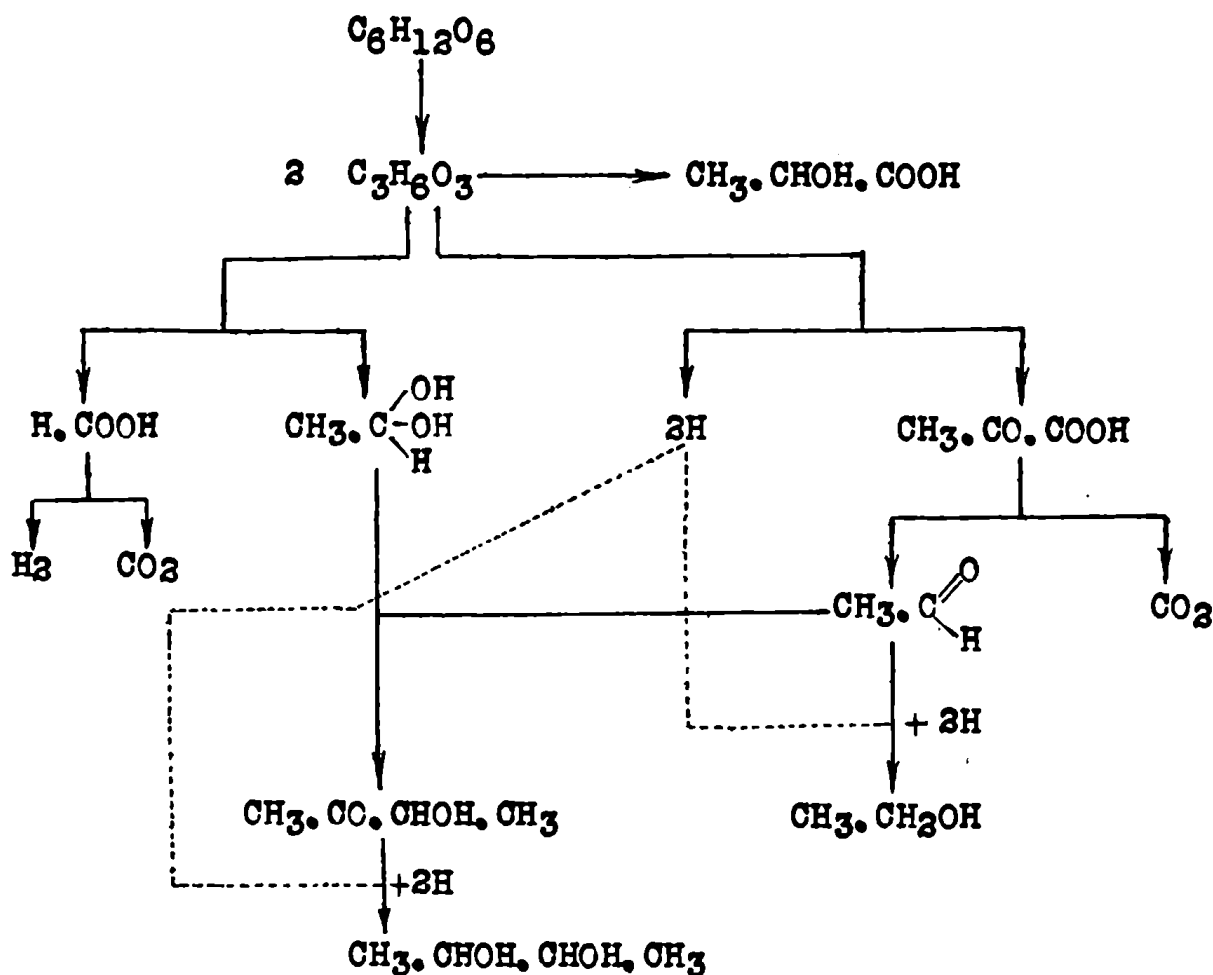
que una de las moléculas de acetaldehida esté hidratada, puede imaginarse que la diferencia reside en que una parte de dicha substancia se forma como hidrato y la otra no. Como es sabido que la acetaldehida cuando está en solución se hidrata parcialmente, parecería sin importancia la observación anterior, pero hay que tener en cuenta que esa transformación es muy lenta en condiciones normales y sólo se puede efectuar cuando la aldehida no es utilizada en otras reacciones, lo que no ocurre en este proceso de fermentación en el cual la acetaldehida puede reducirse con formación de alcohol.

Por otra parte, se ha observado que en la fermentación alcoholica de la glucosa por la levadura no se forma acetilmetilcarbinol aun cuando la acetaldehida es un producto intermedio y la levadura es capaz de producir dicha substancia a partir de aldehida agregada, lo cual esta de acuerdo con la opinion de Kluyver y Donker si se supone que la aldehida formada por descomposición del ácido pirúvico no está hidratada y se reduce a alcohol antes de fijar una molécula de agua. Confirmando esto Kluyver, Donker y Visser<sup>t</sup> Hooft (1) encuentran que en la fermentación alcoholica de la glucosa se forma carbinol cuando otro aceptor de hidrógeno, como ser aire, permite la hidratación de la molécula de aldehida.

Para explicar la formación de los dos tipos de aldehida Scheffer admite que, en la fermentación de glucosa por el B. cloacae, el hidrato de metilgloxal sigue los dos caminos, pirú-

(1) de Scheffer

vico, y, acetaldehida + ác. fórmico, de acuerdo con el siguiente esquema:



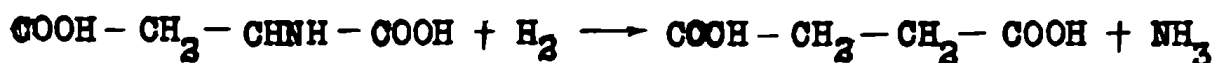
Quando el B. cloacae se desarrolla en agua de levadura con 2% de glucosa, Scheffer no encuentra otros productos finales que los que figuran en este esquema, pero cuando la fermentación se hace en agua de peptona puede constatar la presencia de pequeñas cantidades de ácido acético y ác. succínico.

En cuanto al ácido acético admite que se forma a partir del acetaldehida que, debido al pH mas elevado del agua de

peptona, puede transformarse mas fácilmente segun la reacción de Cannizzaro.

Con respecto al succínico, despues de una serie de experiencias, considera que su formación es completamente independiente de los factores exteriores y que, por otro lado, su ausencia en la fermentación en agua de levadura no es debida al PH diferente. De acuerdo con esto concluye que en la fermentación de glucosa en agua de peptona por el B. cloacae, el ácido succínico se forma probablemente a expensas de componentes característicos de la peptona que pueden ser los ácidos aminados.

Har den<sup>(16)</sup> habia demostrado que el B. coli puede actuar sobre el ácido aspártico formando ácido succínico, reacción que se interpreta asi:

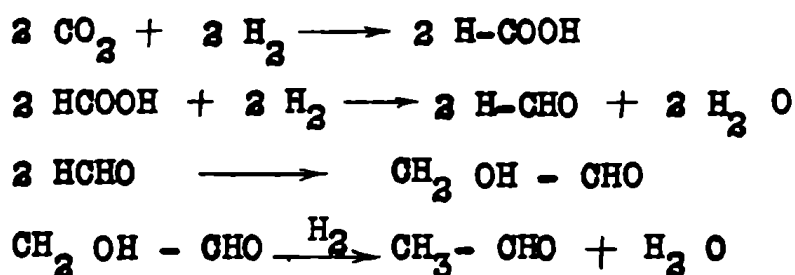


Segun Scheffer con el B. cloacae ocurre algo semejante y es debido a esta reacción que el balance del hidrógeno en las fermentaciones en agua de peptona resulta un poco bajo. De acuerdo con su opinión varias experiencias le demuestran que el B. cloacae es capaz de producir ác. succínico a partir del agua de peptona.

La fermentación de glucosa por el Aerobacter aerogenes segun los resultados de Scheffer, es muy análoga a la del B. cloacae y se puede interpretar con el mismo esquema, pero en este caso siempre hay formación de ácido acético y ác. succínico. Cuando la fermentación se hace en agua de levadura la cantidad de

ácido succínico es pequeña, tanto que la deja de lado, pero en agua de peptona se forman cantidades mayores y el balance de fermentación resulta más aceptable si se admite que proviene en partes iguales de la peptona y la glucosa, lo cual, Scheffer considera un indicio de que el Aerobacter aerogenes es capaz de formar un poco de ácido succínico a partir de la glucosa.

En cuanto al mecanismo de esta reacción, de acuerdo con los resultados obtenidos en los balances de glucosa por el B. coli admitiendo la teoría de Kluyver en un caso y la formación de succínico por condensación de dos grupos de  $C_2$  en otro, Scheffer se decide indudablemente en favor de la primera porque, de aceptar la condensación de dos grupos  $C_2 H_3 O_2$ , para que el balance resulte bien es necesario ampliar el esquema con reacciones tan poco probables como las siguientes



En cuanto a los otros productos que forma el B. coli al fermentar el azúcar, después de considerar detalladamente todos los inconvenientes que aparecen al suponer que el hidrato de metil-glioxal se transforma en lax lugar en ác. pirúvico + agua, en acetaldehida + ác. fórmico, o en ambas direcciones como en los casos anteriores, Scheffer llega a la conclusión de que el más probable es el viejo esquema de Grey (1914) que su mismo autor dejó

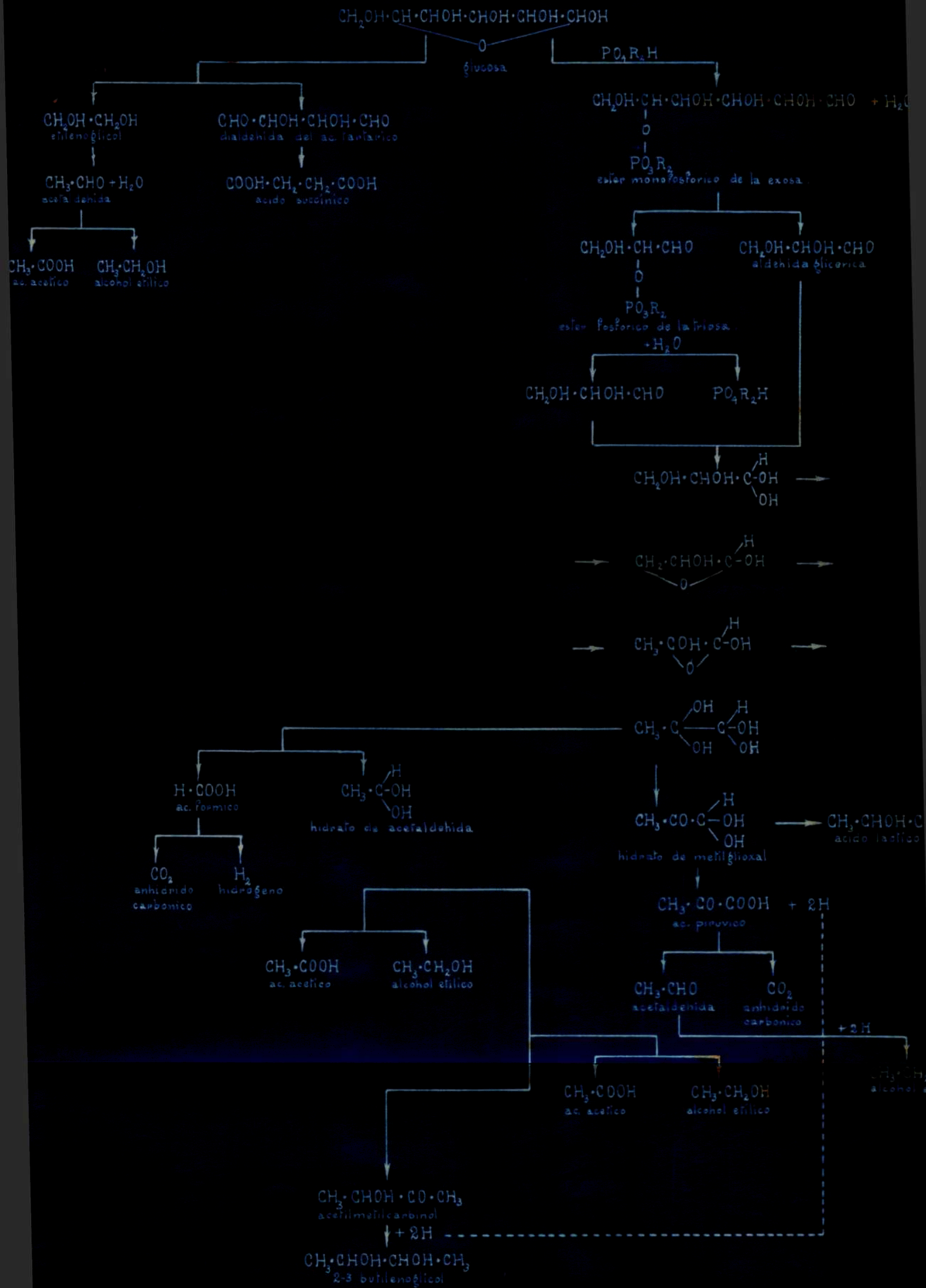
a un lado por no poder explicar el origen del ácido succínico; sin embargo en las fermentaciones en agua de peptona los resultados le hacen suponer que una pequeña parte del metilglicoxal sigue el camino del ácido pirúvico.

Como resultado final de todas sus consideraciones Scheffer admite que con el siguiente esquema<sup>(1)</sup> se pueden explicar los procesos de fermentación de todas las bacterias del grupo coli, entre las cuales la diferencia está en la mayor o menor capacidad de seguir uno u otro camino para transformar la glucosa.

(1) Ver el cuadro de la página 54

ESQUEMA DE LA FERMENTACION DE GLUCOSA POR LAS BACTERIAS DEL GRUPO COLI

de Seneffe



## DISPOSICION DE LAS EXPERIENCIAS

Desde Harden en 1901, hasta Scheffer, en 1928, varios investigadores han hecho determinaciones cuantitativas de los productos de fermentación de glucosa por las bacterias del grupo coli y los dispositivos y las técnicas usadas para efectuar las experiencias se han ido modificando con ventajas de exactitud y sencillez

En los primeros ensayos he seguido el método de Scheffer que es el siguiente: "Se esterilizan durante 10 a 15 minutos a  $120^{\circ}$ , alrededor de 1800 c.c. del medio de cultivo, al cual se ha agregado una gotita de ácido oleico para impedir la formación de espuma en el proceso de fermentación, colocado en un matraz pirex provisto de un tapon de goma atravesado por un embudo de decantación y un tubo con llave de tres vías cuyas dos comunicaciones exteriores, lo mismo que la boca del embudo, deben estar tapadas con algodón del modo usual. Se saca el matraz del autoclave tan caliente como sea posible y se conecta inmediatamente con un gasómetro con nitrógeno de modo que al enfriarse se llena de dicho gas, que previamente se ha lavado con pirogalato alcalino. Cuando llega a tener la temperatura ambiente se introduce por el embudo de decantación 1 c.c. de una suspensión de un cultivo joven de bacterias y luego se conecta, por medio de la llave de tres vías, con un frasco lavador con 500 c.c. de solución de OHK al 20% que a su vez esta en comunicación con otro que tiene 100 c.c. de la solución de OHK y al que sigue un tercero, que sirve de con



trol, con 50 c.c. de la misma solución. Las conexiones deben hacerse vidrio sobre vidrio y con gomas de vacío para evitar pérdidas de gas. Después del último burbujeo en OHK los gases no absorbidos por el Alkali pasan a un frasco medidor de 2 litros, invertido sobre un recipiente con parafina líquida. Cuando todo el aparato ha alcanzado la temperatura deseada ( $37^{\circ}$ ), lo que ocurre después de estar una o dos horas en la estufa, se llena con parafina el frasco medidor mediante un tubo en U que llega hasta el fondo del mismo.

Terminada la fermentación se llena el matraz, usando el embudo de llave, con una cantidad medida de agua para desalojar el gas que está en su interior. Posteriormente, trabajando en colaboración con el Dr. Carlos S. de la Serna, he adoptado las modificaciones del dispositivo, que detallo a continuación algunas de las cuales figuran ya en su tesis de doctorado.

Si se tiene en cuenta que terminada la fermentación, antes de destapar el matraz, hay que separar el anhídrido carbónico disuelto en el medio haciendo pasar una corriente de aire privado del mismo, resulta evidente que el tubo de entrada, que será el del embudo de llave, debe llegar casi hasta el fondo del matraz para que el arrastre sea efectivo. Por eso, cuando se saca el matraz del autoclave sin que haya bajado bastante la temperatura, debido a la disminución de la presión interior, sube el líquido por el tubo llegando a mojar los tapones de algodón, lo que es sin duda un gran inconveniente que se puede evitar esteri-

lizando por separado el matraz con el medio de cultivo tapado con algodón y el tapon con los tubos en un paquete. Este sistema tiene además otra ventaja: Si en la esterilización alguna de las llaves de vidrio se rompe, lo que no es de extrañar, esto no representa un mayor contratiempo porque se pueden tener preparados varios tapones iguales, mientras que de la otra manera, tal percance significaría tener que comenzar de nuevo.

Con esta modificación, siendo imposible evitar la entrada de aire en el matraz, ya no se pueden obtener las condiciones de anaerobiosis según el método holandés; por mi parte logré tales condiciones de la manera siguiente: inmediatamente después de sacar el matraz del autoclave, estando a temperatura bastante elevada, se agita bien para homogeneizar el medio de cultivo, (agua de levadura + 2% de glucosa + 2% de creta) se saca una muestra con una pipeta de bola y se le adapta el tapon correspondiente teniendo siempre las precauciones necesarias para impedir una infección. Luego se conecta el tubo de salida (reemplazamos la llave de tres vías por un tubo de salida y uno de entrada, que llega hasta cerca del fondo del matraz, ambos con llave) con la trompa de vacío y el de entrada con un tubo de nitrógeno comprimido intercalando una espiral lavadora con pirogalato alcalino y una cámara de goma (de pelota de foot-ball) que hace las veces de gasómetro donde se acumula el nitrógeno lavado. No conviene hacer llegar el nitrógeno al matraz a través del embudo de decantación porque la conexión con el aparato productor de gas debe ser com-

pletamente segura, lo que resulta complicado debido al tapon de algodón y sobre todo se corre el riesgo de destapar el embudo durante el manipuleo. Existe el mismo inconveniente si se pretende usarlo como tubo de salida.

Estando cerrada la llave del embudo de decantación y la del tubo de entrada (E) se abre la del tubo de salida (S) y se hace funcionar la trompa de vacío. Cuando el líquido del balón hierve, lo que ocurre enseguida dada la temperatura que tiene, se cierra S y se abre E con cuidado para evitar una entrada violenta de nitrógeno. Al cabo de un rato cuando cesa el burbujeo de nitrógeno en el medio de cultivo, se cierra E, se abre S hasta que el líquido vuelva a hervir o se haya logrado disminuir bastante la presión, y se repite la operación anterior; así cuatro o cinco veces después de lo cual se cierra definitivamente S y se abre E para que a medida que el líquido se enfría se llene de nitrógeno el matraz. El enfriamiento se hace rápidamente colocándolo en un baño, de agua a 37°. Al alcanzar esta temperatura se vierte en el embudo de decantación, con las precauciones necesarias, una suspensión abundante de bacterias de un cultivo joven (12-15 horas) Para que los gérmenes lleguen al medio de cultivo, se abre S cuidando de cerrarla, lo mismo que a la llave del embudo, antes de que haya bajado toda la suspensión. Luego presionando la cámara de goma se hace entrar un exceso de nitrógeno al matraz y se cierra E. En estas condiciones se lleva a la estufa donde se conecta el tubo de salida con la serie de tres frascos lavadores con solución

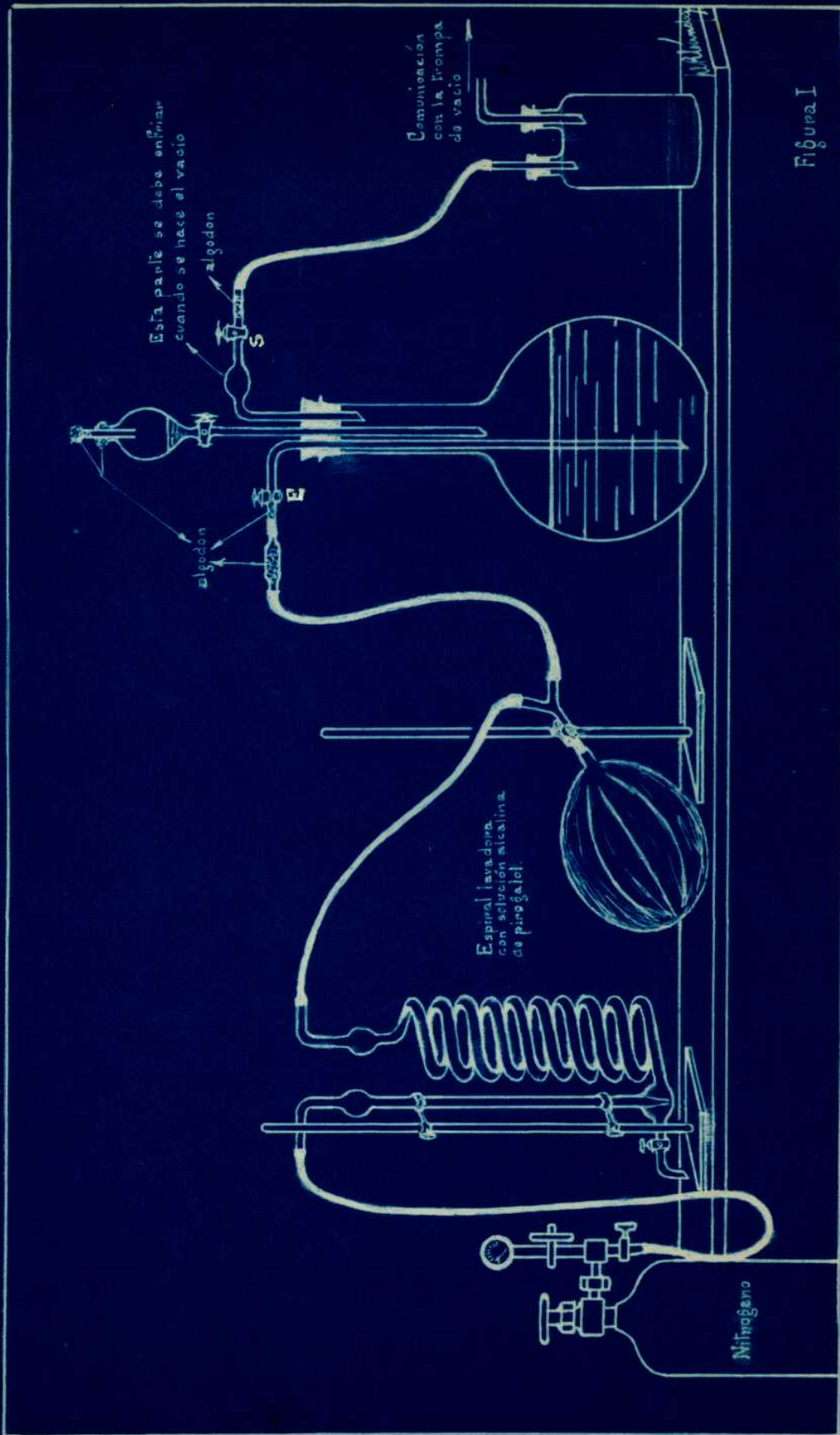


Figura I

de OHK y el frasco medidor con parafina. Al abrir S, debido a que la presión en el interior del matraz es mayor que la atmosférica, el N desaloja el aire del tubo que une al 1er. lavador, lográndose evitar así, lo mismo que con la técnica holandesa, que por difusión del oxígeno se alteren las condiciones de anaerobiosis, pero de una manera mucho mas rápida y sencilla.

El proceso de fermentación dura de dos a tres días y durante este tiempo se debe agitar varias veces el matraz para que el carbonato de calcio al ponerse en suspensión pueda neutralizar la acidez del medio. Cuando ha terminado se desalojan los gases del matraz con una cantidad medida de agua a 37° esteril que se agrega por el embudo de llave, siendo necesario para esto enfriar un poco el matraz hasta que se forme, en el embudo de llave, una columna de agua capaz de vencer la resistencia que ofrece el líquido de los lavadores. Se debe cuidar durante esta operación que el medio no se infecte para sacar luego una muestra y controlar la pureza del cultivo con una coloración de Gram y una siembra en placa. Resulta muy cómodo para sacar dicha muestra, cerrando las llaves E y S abrir la del embudo, calentar suavemente el matraz en la parte no ocupada por el líquido y cuando hayan subido 3 o 4 c.c. , cerrar de nuevo la llave.

El conjunto matraz-lavadores se separa del recipiente colector de gas y se lleva al laboratorio donde se hace pasar una corriente de aire sin anhídrido carbónico para que el disuelto en el medio se fije en la solución de OHK. Esto se debe

hacer rápidamente para evitar las reabsorciones que se producen por el enfriamiento, pero de todos modos es conveniente cerrar S al sacar el aparato de la estufa porque la entrada de una pequeña cantidad de solución de OHK al matríz malograría toda la experiencia.

MÉTODOS ANALÍTICOS EMPLEADOS PARA  
LAS DETERMINACIONES CUANTITATIVAS.

Las sustancias que según el análisis cualitativo de diversos investigadores, producen las bacterias del género *Aerobacter* a partir de la glucosa en condiciones anaerobias son: hidrógeno, anhídrido carbónico, ácidos fórmico, acético, láctico y succínico, acetilmetilcarbinol, 2-3 butilenoglicol, y alcohol etílico. Como no siempre los gérmenes transforman la totalidad de la glucosa del medio de cultivo, es necesario determinar después de la fermentación, además de los productos citados, la cantidad de azúcar transformado. La cantidad de glucosa inicial se determina en la muestra sacada después de la esterilización.

Me he guiado, para el análisis del medio fermentado, por las indicaciones de Scheffer usando los métodos descritos en su tesis, aunque hube de modificar algunos porque no lograba obtener con ellos resultados satisfactorios. Debo hacer notar que el ensayo y la modificación de los métodos analíticos los hice en colaboración con el Dr. Carlos S. de la Serna, quien, salvo una pequeña variación en lo correspondiente a ácidos fijos usó las mismas técnicas para sus determinaciones.

Scheffer ha seguido el método bioquímico de Kluver para las valoraciones de la glucosa controlándolo, a veces, con el método de reducción de Fehling según la modificación de Schoorl; dada la dificultad de encontrar detalladas dichas técnicas

ensavé la descripta por Clarence Schmidt en 1931 (34), con buenos resultados, por lo cual decidí adoptarla para mis determinaciones. Es en esencia el micrométodo de reducción de ferricianuro que Hagedorn y Jensen, en 1923, propusieron para la determinación de la glucosa en sangre y que mas tarde Hannes en 1929 aplicó, con algunas variaciones, para cantidades mayores de azúcar.

Clarence Schmidt empleó este método para la determinación de glucosa en medios de cultivo modificando la concentración de los reactivos para no tener que usar microburetas en la titulación. He elegido este, aunque en bacteriología se usa comunmente el método de reducción de cobre de Shaffer y Hartman adaptado para determinaciones en medios de cultivo por Stiles, Peterson y Fred (35), porque de acuerdo con un trabajo de Magee y Smith (28) las valoraciones con este último no son exactas y aún cuando se obtienen mejores resultados aplicando el Shaffer-Hartman sin previa clarificación, no se logra mayor aproximación del 10%. Merrill (29), por otra parte, en sus estudios sobre el metabolismo de hidratos de carbono por organismos del género *Mycobacterium*, usando la técnica de Stiles, Petersen y Fred tampoco obtuvo mayor exactitud. En cambio con el método descrito por Schmidt los errores no son nunca mayores del 2 - 2,5 %.

Las determinaciones se hacen de la siguiente manera: en un baloncito aforado de 10 c.c. se defeca 1 c.c. de muestra que se debe medir después de haber agitado muy bien el medio de cultivo para que el carbonato de calcio esté en suspensión homo-



genea) con 1 c.c. de solución de  $\text{SO}_4 \text{ Zn}$  y 1 c.c. de  $\text{OH.Na } 0,5 \text{ N}$  (Método de Somogyi 1930) y se lleva a 10 c.c. con agua destilada, se agita y se filtra. Esto considerando que el medio de cultivo tiene aproximadamente 2% de glucosa; si la concentración de azúcar es mayor que esta, hay que defecar y diluir a 10 c.c. menos de 1 c.c. de muestra porque el límite superior del método es 2 mgr. A 1 c.c. de filtrado, medido exactamente en un tubo 200 x 25 mm., se agregan 5 c.c. de solución alcalina de ferricianuro ( 4,2% de  $\text{Fe (CN)}_6 \text{ K}_3$  y 10,6% de  $\text{CO}_3 \text{ Na}_2$  ) y 4 c.c. de agua destilada lavando las paredes del tubo; se hace al mismo tiempo un ensayo en blanco con 5 c.c. de la solución de ferricianuro y 5 c.c. de agua. Los tubos se calientan durante 15 minutos en un baño maria hirviendo enérgicamente y se enfrían luego por inmersión en agua dejándolos 3 o 4 minutos. Se agregan 5 c.c. del reactivo de yoduro de potasio ( IK 25 gr.,  $\text{SO}_4 \text{ Zn}$  50 gr.,  $\text{Cl Na}$  250 gr.  $\text{H}_2 \text{ O}$  destilada hasta 2000 c.c. ) y 5 c.c. de ácido acético al 5%. El iodo puesto en libertad se titula con hiposulfito N/200 que se prepara en el momento de hacer la determinación diluyendo  $\text{S}_2 \text{ O}_3 \text{ Na}_2$  N/10.- Se usan 3 ó 4 gotas de indicador de almidón.

Clarence Schmidt ha dado una tabla de las cantidades de glucosa en función de la diferencia entre los volúmenes de hiposulfito gastados por el testigo y por la solución de azúcar que se valora.

En cuanto a la terminación de glucosa restante en el medio fermentado, Scheffer hace notar que es necesario eliminar

el acetilmetilcarbinol, lo que se logra si se evapora a sequedad en baño maria una cantidad conocida de medio (10 c.c.), se le agrega agua y se vuelve a evaporar repitiendo la operación 5 ó 6 veces despues de lo cual se lleva al volúmen inicial y de ahí se mide 1 c.c. haciendo la dosificación como en el caso anterior. Por si la cantidad de glucosa no fermentada fuera muy pequeña es conveniente hacer dos determinaciones; una, de la manera descripta y otra agregando al c.c. de medio que se defeca 1 c.c. de una solución valorada de glucosa, para que la cantidad de azucar contenida en 1 c.c. del liquido defecado este dentro de los limites del método (0,2-2 mgr.).

De los gases que se desprenden durante la fermentación, el anhídrido carbónico que llega a los lavadores es fijado por el OH.K, de modo que el volúmen recogido en la probeta antes de desalojar los gases del matraz, equivale al hidrógeno mas el anhídrido carbónico que aun no ha pasado por la solución alcalina, pero despues de agregar el agua, como todo el  $\text{CO}_2$  formado durante el proceso ha sido absorbido por el OHK, el gas de la probeta representa en volumen el hidrógeno mas el agua añadida, de modo que la determinación cuantitativa en peso de hidrógeno desprendido durante la fermentación resulta muy sencilla.

La determinación del  $\text{CO}_2$  es mas complicada porque hay que tener en cuenta que los ácidos formados a partir de la glucosa reaccionan con el  $\text{CO}_3$  Ca con desprendimiento de  $\text{CO}_2$ . Algunos investigadores calculan el  $\text{CO}_2$  no correspondiente al pro-

ceso de fermentación, considerando que para cada molécula de ácido se descompone una cantidad equivalente de  $\text{CO}_3\text{Ca}$ , y otros en cambio se basan en el aumento del calcio disuelto en el medio de cultivo. Scheffer (33) considera que ambos métodos son malos: el 1º porque no reaccionan con la creta la totalidad de los ácidos producidos y el 2º porque parte de los iones calcio que se forman por descomposición del  $\text{CO}_3\text{Ca}$  pueden reaccionar con los fosfatos del medio precipitando como fosfato tricalcico. De acuerdo con esto señala como correcto el método de Braak en el cual se determina la cantidad total de  $\text{CO}_2$ , libre y como carbonato, del medio de cultivo antes y después de la fermentación. Suponiendo que se obtengan los valores A y B respectivamente es evidente que  $B - A + \text{el } \text{CO}_2 \text{ fijado por la potasa de los lavadores}$  representa el  $\text{CO}_2$  formado por las bacterias.

Para las determinaciones del  $\text{CO}_2$  total del medio usé un dispositivo semejante al de Fresenius Classen (ver figura II) (37), por no haber podido encontrar detallada la técnica de Scheffer. Se hace pasar durante media hora una corriente de aire, lenta, sin  $\text{CO}_2$ , y recién después se conectan el aparato de absorción y el tubo testigo tarados. Se agita bien, para que sea homogénea, la muestra sacada antes de la fermentación, se miden 25 c.c. y se vierten en el frasco Erlenmeyer por el embudo de decantación tratando de que no entre aire, aunque no son necesarias muchas precauciones porque la cantidad de  $\text{CO}_2$  que puede entrar es pequeñísima con respecto a las cantidades que se determinan.

DISPOSITIVO PARA DETERMINAR EL  $\text{CO}_2$  TOTAL DEL MEDIO DE CULTIVO

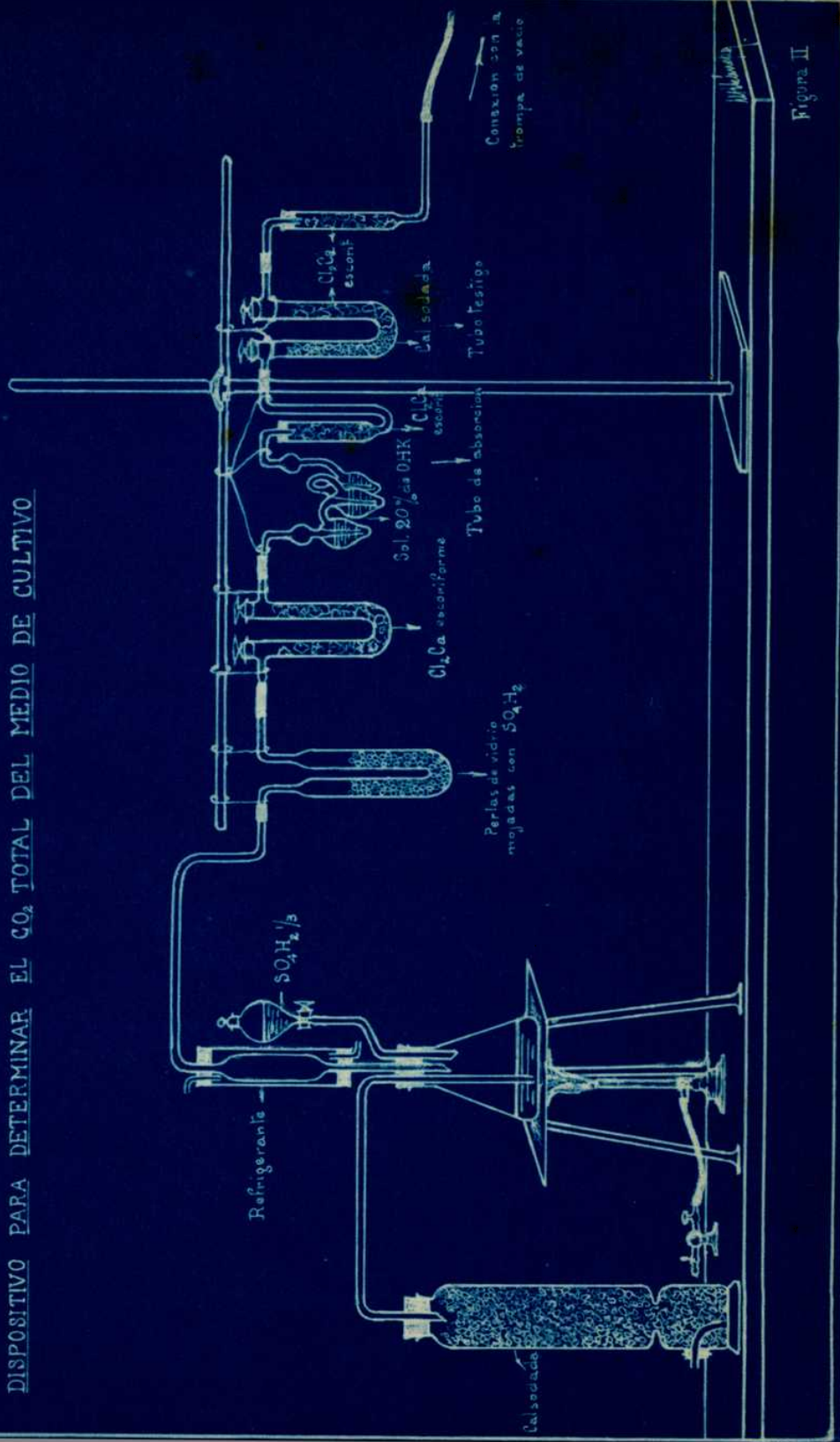


Figura II

Se lava con agua varias veces el embudo para que no quede  $\text{CO}_3 \text{Ca}$  adherido a las paredes y luego se agrega  $\text{SO}_4 \text{H}_2$  al 1/3 haciendo pasar al mismo tiempo una corriente suave de aire sin  $\text{CO}_2$ . La adición de ácido debe ser tal, que en el tubo de Mohr pasen 2 ó 3 burbujas por segundo. Cuando el ataque es ya muy lento se calienta el Erlenmeyer con cuidado, llevando el líquido hasta principio de ebullición. Después de 3/4 de hora más o menos, todo el  $\text{CO}_3 \text{Ca}$  ha sido atacado pero la corriente de aire sin  $\text{CO}_2$  no se interrumpe hasta completar dos horas después de lo cual se pesan de nuevo el aparato de absorción y el testigo.

El  $\text{CO}_2$  fijado por la solución de  $\text{OH.K}$  de los lavadores se determina con el método de Winkler valorando en 5 c.c. de solución diluidos, el alcali total con  $\text{Cl H N}$ . y metilorange como indicador y en otra porción, la alcalinidad correspondiente al  $\text{OH.Na}$  luego de precipitar el carbonato con exceso del  $\text{Cl}_2 \text{Ba}$  y usando fenolftaleína. No se requiere que al preparar la solución alcalina se tengan las precauciones necesarias para que resulte exenta de anhídrido carbónico; basta con conocer que cantidad de  $\text{CO}_2$  tiene. El  $\text{CO}_2$  total del medio después de la fermentación (casi todo corresponde a carbonato porque la mayor parte del disuelto se ha desalojado, como se dijo antes, con una corriente de aire) se determina de la manera descripta.

Como en el medio fermentado hay que dosificar varios productos (9) y conviene comenzar todas las determinaciones el mismo día que se saca el aparato de la estufa para evitar que

se altere, creo de interés detallar la distribución del líquido para el análisis que adopté después de varios ensayos.

Terminado el desalojo del  $\text{CO}_2$  disuelto se destapa el matraz, se marca, en el cuello del mismo, el nivel del líquido para luego medir el volumen, se agita y se vierte el medio fermentado en un balon de tres litros, enjuagando el matraz con una cantidad pequeña, conocida, de agua destilada, con el objeto de que resulte fácil hacerlo perfectamente homogéneo.

25 c.c. --Det. de CO<sub>2</sub>

Conviene hacerla enseguida porque debido a que el medio es ácido continúa liberándose CO<sub>2</sub> y la determ. resultaría inexacta.

Cantidad conocida de medio de cultivo bien agitado.

300 c.c.

Se calienta durante 15' con un refrigerante a reflujo, se deja enfriar, se filtra al vacío en un Buchner con pasta de papel, se mide el volumen filtrado y se usa una parte alícuota para determinar ácidos. El resto, acidificando hasta p.H 1.7, se mantiene a baja temperatura por si fracasa algunas de las dosificaciones.

1900 c.c.

Se filtran al vacío en un Buchner con pasta de papel enfriando el Kitasato con mezcla frigorífica para evitar pérdidas de alcohol. Se mide el volumen filtrado.

se neutralizan exactamente,

1700 c.c. para det. alcohol y 2-3 Butilenoglicol.

200 c.c. para det. acetilmetilcarbinol.

10 c.c. para det. glucosa.

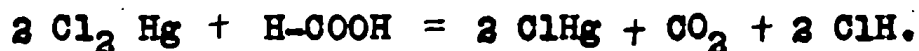
Determinación de ácidos: Se acidifican 100 c.c. con  $\text{SO}_4\text{H}_2$  y se destilan en corriente de vapor de agua. Scheffer recomienda acidificar con cuidado porque un exceso de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  puede originar, con la glucosa restante del medio, ácido fórmico, pero no dice como logra este objeto cuando no se conoce la cantidad de ácidos orgánicos presentes al estado de sales de Ca. Yo he agregado  $\text{SO}_4\text{H}_2$  N. hasta alcanzar p H 1.7. 1.6., usando timol azul como indicador y procediendo por toque, con lo cual los ácidos producidos en la fermentación quedan en libertad sin haber exceso de ácido mineral que pueda molestar. Se conoce aproximadamente la cantidad de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  necesaria haciendo primero un ensayo con una pequeña porción del mismo líquido. Para la destilación por arrastre utilicé  $\text{H}_2\text{O}$  exenta de  $\text{CO}_2$ , colocando la muestra a analizar en un balon Kjeldahl de 1/2 litro provisto de un tubo Kjeldahl porque a veces se forma mucha espuma. Regulando la operación de tal manera, que no varíe el volumen del líquido que se destila y pasen 40-45 gotas por minuto e interrumpiéndola cuando se han recogido 1 y 1/2 litros, se consigue separar bien los ácidos fijos de los volátiles como he comprobado en varios ensayos con soluciones valoradas de los mismos.

En el destilado se determina la acidez total con  $\text{OH.Na}$  N/10 y fenolftaleína como indicador. Scheffer considera que, dado el gran volumen de líquido, es necesario agregar un exceso de 3.5 c.c. de  $\text{OH.Na}$  N/10 y por eso lo resta al valor hallado para tener la acidez correspondiente a ácidos fórmico y acé-



tico. Ensayando con soluciones tituladas de dichos ácidos, tuve errores grandes sobre todo si se tiene en cuenta la pequeña cantidad de ácido fórmico y succínico producido en la fermentación, y en cambio logré resultados satisfactorios añadiendo alcali hasta color rosa, concentrando enseguida el líquido hasta 50-60 c.c. y determinando el exceso de OH.Na con ClH N/10. Se observa mejor el viraje añadiendo exceso medido de ClH y neutralizando con OH.Na. Mientras el líquido concentrado se enfria, para impedir que el OH.Na se carbonate, se tapa el frasco con un tapon atravesado por un tubo largo, doblado en U en la parte superior donde se adapta un tubito con oal soldada.

Para el ácido fórmico Scheffer indica el método de Fincke (24), que es considerado el mejor para dosificar pequeñas cantidades. El líquido concentrado y neutro se pasa a un vaso de precipitación, se añaden 10 c.c. de reactivo que tiene 10% de Cl<sub>2</sub> Hg, 3% de Cl Na y 3-5% de acetato de sodio. Se deja durante 2 horas en baño maria a 100° , se filtra en caliente, se lava el pp. con H<sub>2</sub>O, alcohol-eter y se seca en estufa a 100° una hora. El peso del calomel da la cantidad de ácido fórmico de acuerdo con la siguiente ecuación:



La diferencia entre la acidez volatil total y la correspondiente a ácido fórmico, se considera como debida al ácido acético. La mayoría de los autores han dosificado el acético de este modo.

El residuo de la destilación por arrastre se utiliza para determinar ácidos láctico y succínico. Algunos investigadores lo extraen directamente con eter, pero Scheffer recomienda el método de Fürth, porque de la otra manera, además del peligro de emulsión, se debe extraer durante muchas horas (24 o mas). Fürth usa en realidad la técnica de Bellet (3) para la extracción de ácido láctico que es la siguiente: se concentra en baño maria hasta consistencia siruposa el liquido con el ácido neutralizado; se agrega 1-2 c.c. de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  al 1/5 para dejar el ácido láctico en libertad, se mezcla todo intimamente con  $\text{SO}_4\text{Na}_2$  anhidro y arena calcinada y lavada para tener un polvo homogéneo que se extrae en un Soxhlet especial, mas efectivo que el común, durante 3 horas.

Para neutralizar el residuo con los ácidos fijos seguir la técnica de Bertrand (5). Como las soluciones de ácido láctico siempre tienen una cierta cantidad de ester latil-láctico, al neutralizar el ácido libre se rompe el equilibrio y parte del ester se descompone bastante rápidamente. Debido a esto, Bertrand agrega un exceso determinado de  $\text{OH.Na}$  N. usando fenoltaleina como indicador y calienta cerca de ebullición durante 5' para saponificar el ester; deja enfriar, añade un exceso conocido de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  N. y neutraliza con  $\text{OH.Na}$ .

Después de concentrar el liquido neutro hasta 2-3 c.c. en una capsula chica, acidifíquese con una cantidad de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  1/5 equivalente al  $\text{OH.Na}$  gastado en la neutralización y agregando

$\text{SO}_4\text{Na}_2$  anhidro y arena calcinada formando una pasta que queda en reposo hasta que el  $\text{SO}_4\text{Na}_2$  cristaliza; luego de pulverizar la masa sólida la extraje con eter en un Soxhlet común durante ocho horas.

El extracto etéreo, de acuerdo con Scheffer, se evapora y el residuo se disuelve en alcohol llevando la solución a volumen conocido (yo llevé a 50 c.c.). Una parte alícuota de esta solución ( 25 c.c.) se titula con  $\text{OH.Na}$  N/10 según la técnica de Bertrand y al volumen restante, después de hervirlo con algunas gotas de fenolftaleina para eliminar el  $\text{CO}_2$ , se agrega con cuidado solución saturada en frío de  $(\text{OH})_2\text{Ba}$  hasta color rosa cuidando que la concentración de alcohol no baje de  $70^\circ$  con lo cual precipita solamente el succinato de bario.

Ensayando el método con soluciones tituladas de ácido láctico y ácido succinico obtuve malos resultados y al mismo tiempo el ppdo. era difícil de filtrar. Tal vez la presencia del ester lactil-láctico moleste para una buena separación del lactato y el succinato, cuando se agrega el  $(\text{OH})_2\text{Ba}$  directamente a la solución alcohólica. Debido a estos inconvenientes ensayé otra técnica: 25 c.c. de extracto alcohólico se evaporan a sequedad en un tubo de centrifuga pìrex de 30 c.c. de cabida aproximadamente que se coloca en baño-maria. Se disuelve el residuo en agua y usando una gota de fenolftaleina como indicador, se agrega solución saturada de barita hasta color rosa persistente. Adaptando un tapón de goma atravesado por dos tubos, uno en comunicación con la trom-

pa y otro que llega hasta cerca del nivel del líquido y tiene en el extremo libre un tubo de ensayo perforado en el fondo y lleno de cal sodada, se evapora el líquido rápidamente sin peligro de que se carbonate el pequeño exceso de alcali agregado. Cuando sólo queda 1 c.c. se interrumpe la evaporación y se agregan 23 c.c. de alcohol de 96°, se agita bien con una varilla y se centrifuga durante 10'. Se repite el lavado con 25 c.c. de alcohol de 92° 2 ó 3 veces hasta que el líquido centrifugado no se enturbie con  $\text{SO}_4 \text{H}_2$ . El succinato de Bario se seca durante una hora en estufa a 100° y se pesa.

El ácido láctico resulta de la diferencia entre la acidez fija total y la correspondiente al succínico.

En los ensayos con esta técnica no se tuvieron errores mayores del 2-3,5 % .

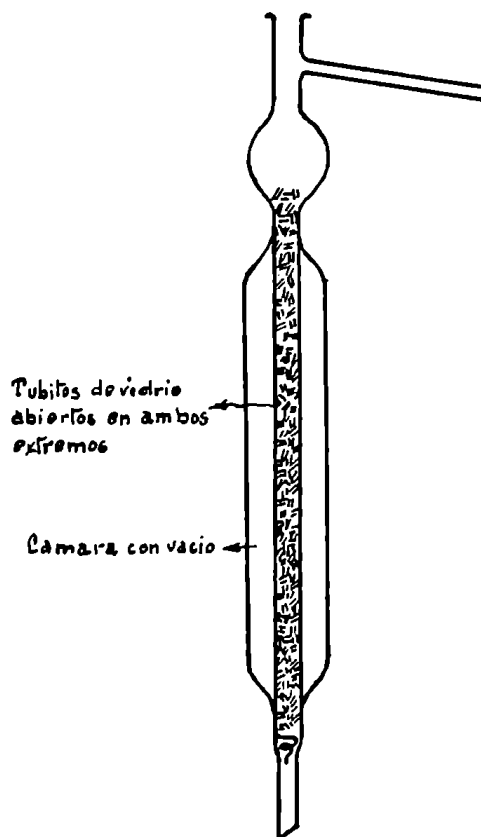
#### Determinación de alcohol y 2-3 Butilenoglicol.-

He usado para el alcohol el método piconométrico que es el que adoptó Scheffer luego de comprobar que no molestan las pequeñas cantidades de acetilmetilcarbinol formadas en el proceso de fermentación.

Hace una serie de redestilaciones, recogiendo siempre la mitad del líquido inicial, hasta tener 150 ó 200 c.c. que destila con un fraccionador (por la descripción parece ser de Vigreux) y en los primeros 50 c.c. que pasan determina el peso específico.

Yo opté por hacer solo dos destilaciones sucesivas

pero con un fraccionador muy efectivo, el tubo de Hempel (fig.), interrumpiendo la primera al cabo de 15' aproximadamente que la temperatura de ebullición es 100°, y recogiendo en la segunda 25 c.c.



para la determinación piconométrica. De esta manera se evitan posibles pérdidas de 2-3 butilenoglicol.

Para la determinación del glicol sigui el método descrito por Scheffer, con ligeras modificaciones, que consiste en lo sig: se concentra\* el residuo de la 1ª destilación hasta reducirlo a 600-700c.c., se deja enfriar y se filtra al vacío en un Buchner con pasta de papel para separar el ppdo. formado durante la ebullición prolongada. Una parte alícuota del

filtrado (450 c.c.±) se sigue concentrando de igual manera hasta llegar a 40-50 c.c.; este residuo se pasa a una capsula y se mezcla con bastante cantidad de  $\text{SO}_4\text{Na}_2$  anhidro para tener un polve seco que se extrae en un Soxhlet, durante 10 horas, con eter destilado sobre sodio. Scheffer determina el 2-3 butilenoglicol pesando el extracto después de evaporar el disolvente, pero para eliminar las sustancias grasas que extrae el eter y que impurifican el el glicol, en mis determinaciones, luego de pesarlo, disolvia el extracto en agua y filtraba por un papel de filtro tarado que, terminada la operación, luego de colocarlo en un pesafiltro hacia \*

a fuego directo con el fraccionador

seca en estufa a  $100^{\circ}$  durante una hora.

El peso correspondiente a las impurezas se resta del peso total.

Determinación de acetilmetilcarbinol.—He seguido el método descrito por Van Niel (38) que es el siguiente : A la fracción correspondiente de medio fermentado se le agrega un exceso de solución de  $\text{Cl}_3\text{Fe}$  al 20% (alrededor de 50 c.c.), con lo cual el carbinol se oxida a diacetilo, y la mezcla se destila recogiendo el destilado sobre una solución que contenga, para cada 100 mgr. de diacetilo 2 c.c. de solución de cloruro de hidroxilamina al 20% , 3-5 c.c. de solución de acetato de sodio al 20% y 1-2 c.c. de solución de cloruro de níquel al 10%. Conviene intercalar entre el matraz y el refrigerante un tubo de Kjeldahl y calentar muy lentamente porque se forma mucha espuma. Cuando han pasado  $\frac{3}{5}$  del líquido inicial se cierra el frasco con el destilado y se coloca en baño-maria a  $80^{\circ}$  durante una hora, luego se deja enfriar, para que disminuya la presión interior, se filtra, se lava el precipitado con agua caliente y se ca en estufa a  $110^{\circ}$ .

Del peso de la dimetilglioxima de níquel se deduce la cantidad de acetilmetilcarbinol .

## RESULTADOS EXPERIMENTALES

Siguiendo lastécnicas descriptas estudié el proceso de fermentación de la glucosa por las tres cepas del género *Aerobacter* a que me referí anteriormente, usando siempre agua de levadura con 2% de azucar y 3% de creta; preparé el agua de levadura de acuerdo con la fórmula de Beijerinck: levadura prensada (libre de almidon) .....200gr.  
 agua destilada.....c.c. 1000 c.c.

Con ayuda de un pison de mortero se mezcla bien la levadura con poca agua, luego se pasa el liquido espeso a un balon de 3 litros, añadiendo al agua restante y una clara de huevo, se agita, y se lleva al autoclave 15' a 120° para que coagule; se filtra al vacio con pasta de papel y se completa el litro.

El carbonato de calcio que se agrega al agua de levadura debe ser esterilizado previamente 1 hora a 170° en horno Pasteur, por la presencia de ciertos gérmenes difíciles de eliminar.

Los resultados fueron los siguientes:

Cuadro I.N 3094. (Aerobacter aerogenes del laboratorio de Delft).

Sustancia	Gramos	% de la glucosa ferment.	% del C. de la gl. ferment.
Glucosa añadida	35.6		
Glucosa restante	1.5		
Glucosa consumida	34.1	100	100
Anhidrido carbónico	11.5	33.9	23.1
Hidrógeno	0.18	0.5	--
Acido fórmico	0.22	0.6	0.4
Acido acético	0.28	0.8	0.8
Acido láctico	6.9	20.3	20.3
Acido succínico	0.8	2.4	2.5
Alcohol etílico	4.1	12.	15.7
Acetilmetilcarbinol	0.19	0.6	0.8
2-3 Butilenoglicol	7.2	21.2	28.6
Total.	$\frac{H_2}{CO_2} = 0.34$	92.3	92.2



Substancias	Cuadro II Nº 50 forma no capsulada		Cuadro III Nº 50 forma capsulada	
	gramos	% de la gluc. fermentada.	gramos	% de la gluc. fermentada.
Glucosa añadida	36		35	
" restante	4		6	
" consumida	32	100	29	100
Anh. carb.	6.4	20	5.8	20
Hidrógeno	0.18	0.56	0.16	0.55
Ac. form.	0.19	0.6	0.08	0.28
Ac. acet.	1.5	4.7	1.57	5.4
Ac. lact.	12.8	40.	10.4	36.
Ac. succ.	1.7	5.3	1.34	4.6
Alcoh. et.	3.3	10.	2.9	10.
Acet. met. carb.	0.33	1.	0.26	0.9
2-3 But. glic.	4.	12.5	3.	10.
	$\frac{H_2}{CO_2} = 0.61$	94.7	$\frac{H_2}{CO_2} = 0.61$	87.7
		95.6		87.9

Quiero hacer algunas consideraciones en lo que se refiere a la exactitud de esta clase de experiencias. Harden (15), al elegir agua de peptona para sus ensayos, se basó en que, a partir de esta substancia el B. coli no forma gases ni ácidos en cantidades apreciables. Otros investigadores siguieron usando agua de peptona y de Graaff y le Fevre, por ejemplo, hicieron también ensayos en blanco con resultados negativos. Scheffer ha utilizado mucho agua de levadura y teniendo en cuenta el resultado de estos estudios efectuados en Holanda, decidí usar la misma substancia como alimento nitrogenado. Sin embargo, desafortunadamente después de mis experiencias, hice un ensayo de fermentación en agua de levadura sin azúcar, con 3% de  $\text{CO}_3\text{Ca}$  y en condiciones de anaerobiosis, con la cepa n° 3094, que pertenece a una de las especies que estudió Scheffer, y pude comprobar que se forma una cierta proporción de gases y sobretudo que, analizando el medio fermentado, se encuentran pequeñas cantidades de ácidos fórmico y succínico y un resto de acidez fija y volátil que, de acuerdo con los métodos empleados se adjudicarían a ácidos láctico y acético respectivamente. Las cantidades encontradas fueron las siguientes:

Ac. fórmico.....	en 1700 c.c. de agua de levadura....	0,088 gr.
Ac. acético.....	en 1700 c.c. de agua de levadura....	0,19 gr.
Ac. láctico.....	en 1700 c.c. de agua de levadura....	0,53 gr.
Ac. succínico....	en 1700 c.c. de agua de levadura....	0,64 gr.

Si bien estos valores no influyen del punto de vista del balance total, influyen en lo que se refiere a las cantidades parciales

de ácidos fórmico, acético y succinico sobretodo y esto es muy digno de tener en cuenta, si se recuerda el valor relativo que tiene un balance de fermentación cuando es satisfactorio, dado que, como se observa en el trabajo de Scheffer, con varios esquemas se puede explicar un proceso de fermentación sin descuidar las exigencias cuantitativas y son entonces pequeños detalles los que hablan en favor de una u otra interpretación.

En los resultados presentados aquí no se han hecho, sin embargo, las correcciones correspondientes a las precedentes indicaciones por no haberlas considerado de importancia para el balance total.

## INTERPRETACION QUIMICA DEL PROCESO DE FERMENTACION

### CONSIDERACIONES FINALES

Comparando el cuadro I con los resultados que obtuvo Scheffer con un germen de la misma especie (ver Cuadro IV), se pueden apreciar diferencias grandes en las cantidades parciales de los distintos productos de fermentación. En el caso de la cepa n° 3094, se ha transformado una proporción mucho mayor de glucosa en ácido láctico (30%) con considerable disminución de las cantidades de alcohol etílico y 2-3 butilenoglicol. Es menor también la proporción de ácido fórmico y, sobre todo, la relación entre ac. fórmico y ac. acético se ha modificado de tal manera, que ya no sería imposible suponer que ambos se originan del ácido pirúvico, es decir, desaparecería un argumento en el cual se basa Scheffer para admitir que el esquema del ácido pirúvico solo, no explica el mecanismo de la formación de todas las sustancias que se producen a partir del azúcar aunque sin embargo teniendo en cuenta sus demás consideraciones es mas probable el camino:

hidrato de metilglioxal  $\longrightarrow$  ácido fórmico + acetaldehida

Comparando los cuadros II y III se puede ver que tanto la forma no capsulada como la capsulada del germen designado con el n° 50 (obtenidas como se ha indicado en la pag. 9 ) transforman la glucosa de una manera muy semejante, aún cuando en el 2° caso el porcentaje de glucosa fermentada que se recupera en los productos de descomposición es menor, debido sin duda, como sugirió el

## Cuadro IV

Cuadros X y Xa de la tesis de Scheffer.

A. aerogenes en agua de levadura con 2% de glucosa y 2% creta.

Productos	gramos	% de la gluc. ferment.	% del c. de la gluc. fer	Moles de sust por 50 moles de glucosa.		
				CO <sub>2</sub>	H <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> -CHO
Gluc. añadid.	37.80					
Gluc. restant.	0.00					
Gluc. ferment.	37.80	100	100			
Anh. carbon.	14.87	39.3	26.8	80.5	--	--
Hidrog.	0.20	0.5	--	--	23.8	--
Ac. form.	0.72	1.9	1.2	3.7	3.7	
Ac. acet.	0.21	0.5	0.5	--	0.8	0.8
Ac. lact.	2.12	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6
Ac. succín.	0.80	2.1	--	--	--	--
Acet.met.carb.	vestigios	--	--	--	--	--
2-3 But. glic.	9.98	26.4	35.2	--	26.4	52.8
Alc. etíl.	6.42	17.	22.2	--	33.2	33.2
Total.	$\frac{H_2}{CO_2} = 0.29$		91.5	89.8	91.9	92.4

Doctor A. Sordelli, a la cantidad de hidrato de carbono que la bacteria utiliza para la formación de la capsula; pero frente a los resultados obtenidos con la cepa n° 3094, se observa que las cepas n° 50 produciendo doble cantidad de ácido láctico y mayor proporción de ácidos acético y succínico.

Si se trata de explicar el mecanismo del proceso de fermentación que llevan a cabo estos gérmenes con el esquema compuesto de Scheffer, los resultados del balance son aceptables, sobre todo para la cepa n° 3094. (ver cuadros I' II' y III' )

Aún cuando en este caso se podría dejar de lado el ácido succínico, como hace Scheffer, no ocurre lo mismo con las cepas n° 50, dada las cantidades que producen de dicho ácido, por lo cual lo he tenido en cuenta al hacer los tres balances de fermentación.

De acuerdo con sus experiencias Scheffer dijo lo siguiente: "Parece haber un encadenamiento en los procesos de fermentación de glucosa por el B. cloacae, el B. aerógenes y el B. coli. Comenzando por el caso del B. cloacae, donde lo típico es que la descomposición de glucosa según el esquema del ácido pirúvico, es decir una fermentación igual a la producida por la levadura en la fermentación alcohólica, predomine cuantitativamente con respecto a la descomposición de acuerdo al esquema del ácido fórmico, se pasa al B. aerógenes donde este último tipo de transformación comienza a acentuarse, al mismo tiempo que hay un principio de descomposición del azúcar en la dirección ácido láctico por un lado y aci-

Cuadro I'

N° 3094

Sustancia	Gramos	Moles de sust. por 50 moles de glucosa.		
		CO <sub>2</sub>	H <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> -CHO
Glucosa añadida	35.6			
Glucosa restante	1.5			
Glucosa consumida	34.			
Anhidrido carbónico	11.5	69.3	--	--
Hidrógeno	0.18	--	24	--
Acido fórmico	0.22	1.3	1.3	--
Acido acético	0.28	--	-1.2	1.2
Acido láctico	6.9	20.3	20.3	20.3
Acido succínico	0.8	3.6	3.6	1.8
Acetilmetil carbinol	0.19	--	--	1.4
2-3 Butilenoglicol	7.2	--	21.2	42.4
Alcohol etílico	4.1	--	23.7	23.7
Total		94.	83.	91.

Quadro II'

Nº 50 forma no capsulada

Substancia	gramos	Moles de sustancia por 50 moles de glucosa fermentada.		
		CO <sub>2</sub>	H <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> -CHO
Glucosa añadida	36			
" restante	4			
" consumida	32			
Anhidrido carb.	6.4	41	--	--
Hidrógeno	0.18	--	25.3	--
Ac. fórmico	0.19	1.2	1.2	--
Ac. acético	1.5	--	-7.	7.
Ac. láctico	12.8	40.	40.	40.
Ac. succínico	1.7	8.	8.	4.
Acetilmetilcarbinol	0.35	--	--	2.2
2-3 Butilenoglicol	4.	--	12.5	25.
Alcohol etílico	3.3	--	20.2	20.2
Total		90	100	98



## Cuadro III'

Nº 50 forma capsulada

Sustancias	gr.	Moles de sustancia por 50 moles de glucosa		
		CO <sub>2</sub>	H <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> -CHO
Glucosa añadida	35			
Glucosa restante	6			
Glucosa consumida	29			
Anhidrido carbónico	5.8	41.	--	--
Hidrógeno	0.16	--	24.8	--
Acido fórmico	0.08	0.5	0.5	--
Acido acético	1.57	--	- 8.1	8.1
Acido láctico	10.4	36	36	36
Acido succínico	1.34	7	7	3.5
Acetilmetilcarbinol	0.26	--	--	1.9
2-3 Butilenoglicol	3	--	10	20
Alcohol etílico	2.9	--	19.6	19.6
<b>Total</b>		<b>85</b>	<b>90</b>	<b>89</b>

do succinico por otro, llegando finalmente al B. coli, donde estas dos últimas reacciones predominan y en casos determinados el esquema del ácido fórmico desplaza por completo al del ácido pirúvico. "

En mis experiencias, tal vez por diferencias de las condiciones en las cuales se efectuaron, la cepa n° 3094 se acerca mucho mas al B. coli, sobre todo en lo que se refiere a la formación de ácido láctico, pero siempre predomina la transformación del hidrato de metilglicoxal en ácido pirúvico sobre el camino acetaldehida + fórmico. Las cepas n° 50 se asemejan mucho mas al B. coli porque transforman alrededor del 45 % de la glucosa en ácidos láctico y succinico, pero mantiene la característica genérica de la producción de acetilmetilcarbinol y 2-3 butilenoglicol que, de acuerdo con los resultados presentados en este trabajo es, en lo que se refiere a la fermentación de glucosa, la única diferencia indistigible que lo separa del B. coli.

*Estadística*



## BIBLIOGRAFIA

- (1) Aubel, E. et Salabartan, J.- Mécanisme de la production d'hydrogène aux dépens du glucose par le bacille Coli.-  
C.R. Acad. Sc.-180, 1183, 1925
- (2) Aubel, E. et Salabartan, J.- Signification des produits de doublement formes par le bacille Coli aux dépens du glucose.-C.R. Acad. Sc.-180, 1784, 1925
- (3) Bellet, M. A.-Nouvelle méthode de dosage de l'acide lactique.-  
Bull. Soc. Chim.-13, 565, 1913
- (4) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.
- (5) Bertrand, G.-Guide pour les manipulations de chimie biologique  
Paris. 1913
- (6) de Graaff, W. C.-Ned. Tijdschr. Hyg. Micr. en Sereologie.-1, 43, 1926
- (7) de Graaff, W. C. und le Febvre, A. J.- Beiträge zur Kenntnis der bakteriellen Gärungen insbesondere in der Koli-Typhus gruppe.-Bioch. Z.-155, 313, 1925
- (8) Donker, H. J. L.-Tijdschr. v. Verg. Geneesk.-11, 1924
- (9) France, R. L.- Studies of Bacterium coli in privately owned rural water supplies.-Journ. Bact.-25, 623, 1933

- (10) Fürth, O. und Lieben, F. - Weitere Untersuchungen über Milchsäurezerstörung durch Hefe. - Bioch. Z. - 132, 165, 1922
- (11) Grey, E. C. - The enzymes which are concerned in the decomposition of glucose and mannitol by Bacillus coli communis. Part. Roy. Soc. B. - 87, 473, 1914
- (12) Grey, E. C. - The enzymes which are concerned in the decomposition of glucose and mannitol by Bacillus coli communis. Part II. - Experiments of short duration with an emulsion of the organisms. - Proc. Roy. Soc. B. - 90, 75, 1919  
Part III. - Various phases in the decomposition of glucose by an emulsion of the organisms. - Idem. - 90, 92, 1919  
Part IV. - The fermentation of glucose in the presence of formic acid. - Idem. - 91, 294, 1920
- (13) Grey, E. C. and Young, E. G. - The enzymes of Bacillus coli communis. Part V. a) Anaerobic growth followed by anaerobic fermentation. b) The effects of aeration during the fermentation. - Proc. Roy. Soc. B. 93, 135, 1921
- (14) Grey, E. C. - The latent fermenting powers of bacteria. - Proc. Roy. Soc. B. - 96, 156, 1924
- (15) Harden, A. - The chemical action of B. coli communis and similar organisms on carbohydrates and allied compounds. - Journ. Chem. Soc. - 79, 610, 1901

- (16) Harden, A. - Journ of Hygiene. -5, 488, 1905
- (17) Harden, A. - On Voges and Proskauer's reaction for certain bacteria. - Proc. Roy. Soc. - B. -77, 424, 1906
- (18) Harden, A. and Norris, D. - The bacterial production of acetylmethylcarbinol and 2-3 butyleneglicol from various substances. - Part I. - Proc. Roy. Soc. B. -84, 493, 1913  
Part II. - Idem. -85, 73, 1913
- (19) Harden, A. and Penfold, W. J. - The chemical action on glucose of a variety of *Bacillus coli communis* (Escherich), obtained by cultivation in presence of chloroacetate (preliminary notice). - Proc. Roy. Soc. -85, 415, 1913
- (20) Harden, A. and Walpole, G. S. - Chemical action of *Bacillus lactis aerogenes* (Escherich) on glucose and mannitol: production of 2-3 butyleneglicol and acetylmethylcarbinol. - Proc. Roy. Soc. B. -77, 399, 1906
- (21) Kluver, A. J. - The chemical activities of micro-organisms. London. -1931
- (22) Kluver, A. J. en Donker, H. J. L. - Versl. Kon. Akad. v. Wet., A'dam 33, 895, 1924
- (23) Kluver, A. J. en Donker, H. J. L. - Chemie der Zelle u. Gewebe. - 13, 134, 1926
- (24) König, J. - Chemie der menschlichen Nahrungs und Genussmittel. Tomo III-3<sup>era</sup> parte - pag 457. (Método de Fincke)

- (25) Koser, S. A. - Correlation of citrate utilization by members of the colo-aerogenes group with others differential characteristics and with habitats. - Journ. Bact., -9, 59, 1924
- (26) Leifson, E. - An improved reagent for the acetyl-methyl-carbinol test. - Journ. Bact., -23, 353, 1932
- (27) Lindsey, G. A. and Meckler, C. M. - Two rapid methods for distinguishing between Escherichia coli and Aerobacter aerogenes. - Journ. Bact., -23, 115, 1932
- (28) Magee, M. C. and Smith, H. G. - A study of methods for the determination of reducing sugars in bacteriological media. - Journ. Bact., -19, 125, 1930
- (29) Merrill, M. H. - Carbohydrate metabolism of organisms of the genus Mycobacterium - Journ. Bact., -20, 235
- (30) Neuberg, C. und Nord, F. F. - Anwendungen der Abfangmethode auf die Bakteriengärungen I.  
Acetaldehyd als Zwischenstufe bei der Vergärung von Zucker Mannit und Glycerin durch Bacterium coli, durch Erreger der Ruhr und des Gasbrandes. - Bioch. Z., -96, 133, 1919
- (31) Neuberg, C., Nord, F. und Wolff, E. - Acetaldehyd als Zwischenstufe bei der Vergärung von Zucker durch B. lactis aerogenes. - Bioch. Z., -112, 144 1920
- (32) Ruchhoft, C. C., Kallas, J. G., Chin, B. and Coulter, E. W. - Coli-aeroge-

- nes differentiation in water analysis.-  
Journ. Bact.-21, 407, 1931
- (33) Scheffer, M. A.-De suikervergisting door bacteriën der Coli groep.-Diss Delft, 1938
- (34) Schmidt Jr, C. F.-Determination of carbohydrates in bacteriological culture media.-Journ. Bact.-23, 36, 1931
- (35) Stiles, H. R., Peterson, W. H. and Bred, E. B.-A rapid method for the determination of sugar in bacterial cultures.-  
Journ. Bact.-13, 437
- (36) Somogyi, M.-A method for the preparation of blood filtrates for the determination of sugar.-Journ. Biol. Chem.-  
86, 655
- (37) Treadwell.-Tratado de química analítica. Tomo II pag 353  
(Método de Fresenius-Classen)
- (38) van Niel, C. B.-Notiz über die quantitative Bestimmung von Diacetyl und Acetylmethylcarbinol.-Bioch. Z.-187, 472
- (39) Virtanen, A. I. u. Simola, P. E.-Über die Gärung des Zuckers durch Coli-Aerogenes Bakterien.-  
Z. physiol. Ch.-163, 384, 1927
- (40) Walpole, G. S.-The action of Bacillus lactis aerogenes on glucose and mannitol. Part II-The investigation of

the 2-3 Butanediol and the Acetylmethylcarbinol formed; the effect of free oxygen on their production; the action of B. lactis aerogenes on fructose.-

Proc. Roy. Soc. B.-83, 273, 1911

(41) Werkman, C. H.-An improved technic for the Voges-Proskauer test  
Journ. Bact.-20, 121, 1930

(42) Werkman, C. H. and Guillen, G. F.-Bacterie producing trimethylene glycol.-Journ. Bact.-23, 167, 1932

(43) Thompson, J.-The chemical action of Bacillus cloacae (Jordan) on glucose and mannitol.-Proc. Roy. Soc. B.-84, 500, 1912