

## Tesis de Posgrado

# Contribución al estudio del metabolismo hidrocarbonado del *Lactobacillus acidophilus*

Pini, Delia Esther

1947

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:**

Pini, Delia Esther. (1947). Contribución al estudio del metabolismo hidrocarbonado del *Lactobacillus acidophilus*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_0498\\_Pini.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0498_Pini.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Pini, Delia Esther. "Contribución al estudio del metabolismo hidrocarbonado del *Lactobacillus acidophilus*". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1947. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_0498\\_Pini.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0498_Pini.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

CONTRIBUCION AL ESTUDIO DEL METABOLISMO HIDROCARBONADO

DEL LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS

FORA.

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO

DE DOCTORA EN QUIMICA

POR

DELIA ESTHER PINI

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FISICAS Y NATURALES

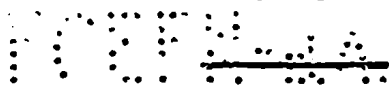
ESCUELA DE QUIMICA

1947

*Tesis : 493*

# CONTRIBUCION AL ESTUDIO DEL METABOLISMO HIDROCARBONADO

## DEL LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS



La fermentación de los hidratos de carbono por las bacterias del ácido láctico ha sido objeto de numerosas investigaciones, como consecuencia de las cuales se ha llegado a determinar la naturaleza de los productos finales de la fermentación de los azúcares por las distintas especies de este grupo de bacterias.-

En el presente trabajo se ha estudiado la fermentación de la glucosa por dos cepas de bacterias lácticas pertenecientes al género Lactobacillus; una es el Lactobacillus acidophilus y proveniente de materia fecal de niño y otra, correspondiente al mismo género, aislada de vagina humana.-

En ambos casos se estudió el metabolismo de la glucosa, estableciendo el balance de la fermentación por la determinación cuantitativa de los productos de la transformación.-

Las razones por las cuales se eligieron dichas cepas fueron las siguientes: se sabe que en el intestino del niño recién nacido, existe el L.acidophilus y se piensa que una posible fuente de contaminación del mismo puede ser el ambiente vaginal de la madre.-

En el Instituto Nacional de la Nutrición fué realizado por la Dra M. S. Cataldi un trabajo investigando la microflora intestinal de los lactantes y la microflora vaginal de la madre. El estudio de esta última dió como resultado el hallazgo de fermentos lácticos, unos de tipo anaerobio identificados como L.bifidus y otros que forman parte del grupo del llamado Bacilo de Döderlein constituido probablemente, según la autora, por dos especies distintas; una de ellas no gasógena que corresponde al L.acidophilus y otra no identificada, que tiene la

propiedad de formar gas con los hidratos de carbono.-

En el presente trabajo se estudiaron: una cepa de L.acidophilus típica y una de las cepas gasógenas aislada de vagina por la Dra. Cataldi, con el objeto de ver si existía alguna analogía o diferencia fundamental en su metabolismo.-

## I. Antecedentes

En 1901 Gayon y Dourog, estudiaron la fermentación de la glucosa por algunas bacterias lácticas y hallaron como productos finales, ácido láctico, ácido acético, ácido succínico y glicerina, ácido fórmico y anhídrido carbónico y alcohol etílico. Dieron la descripción de las bacterias, pero no intentaron nombrarlas ni clasificarlas,

Los mismos productos fueron encontrados por Kayser(1904), Laborde(1909) y Smit (1913).

En 1919 Orla-Jensen sugirió que las bacterias lácticas que convierten esencialmente los hidratos de carbono en ácido láctico y solo dan trazas de otras sustancias, debían ser distinguidas de aquellas que además de él, producen cantidades apreciables de ácidos volátiles y de anhídrido carbónico. Cluyver y Donker (1924) propusieron los términos homofermentativo y heterofermentativo respectivamente, para los dos grupos.

En 1920 Fred. Peterson y Davenport y en el mismo año Fred y Peterson estudiaron la fermentación de la glucosa por el Lactobacillus pentosaceticus y confirmaron la ruptura secundaria del ácido láctico.

En 1929 Pederson realizó un estudio cuantitativo del metabolismo de varias especies de Lactobacillus.

En 1930 Hunt y Rettger llevan a cabo un estudio comparativo de los miembros del género Lactobacillus y al siguiente año Rettger y Weinstein estudian biológicamente y químicamente dicho género, refiriéndose especialmente al Lactobacillus pentosaceticus.

Curran, Rogers y Whittier (1933) en un trabajo sobre las características del L. acidophilus, bacteria del grupo homofermentativo, encuentran además de ácido láctico, ácidos volátiles y comprueban que estos están constituidos por ácido fórmico, ácido acético, y ácido butírico en la proporción 6:3:1.

En el mismo año Hunt realiza un estudio del metabolismo del L.pent-  
toaceticus relacionandolo con el de otros varios miembros del grupo y  
comprueba tambien la ruptura del ácido láctico.- Además de l L.pentoa-  
cticus utilizó el L.delbrücki el L.leichmanni y el L.odontolyticus.-

En 1935 Nelson y Werkman en una fermentación que utilizaba ácido  
pirúvico como sustrato y en anaerobiosis, observaron usando L.lycopersi-  
cila formación de ácido acético, anhídrido carbónico y ácido láctico en  
cantidades equimoleculares. Es decir, que en la fermentación se formaría  
intermediariamente ácidopirúvico. La molécula de láctico se rompería en  
acético. anhídrido carbónico e hidrógeno activo, el cual reduciría una  
segunda molécula de pirúvico a láctico. Según esto deben existir acepto-  
res de hidrógeno en la fermentación de la glucosa. puesto que el hidró-  
geno no es un producto final. de dicha fermentación y si lo es de la del  
ácido pirúvico.-

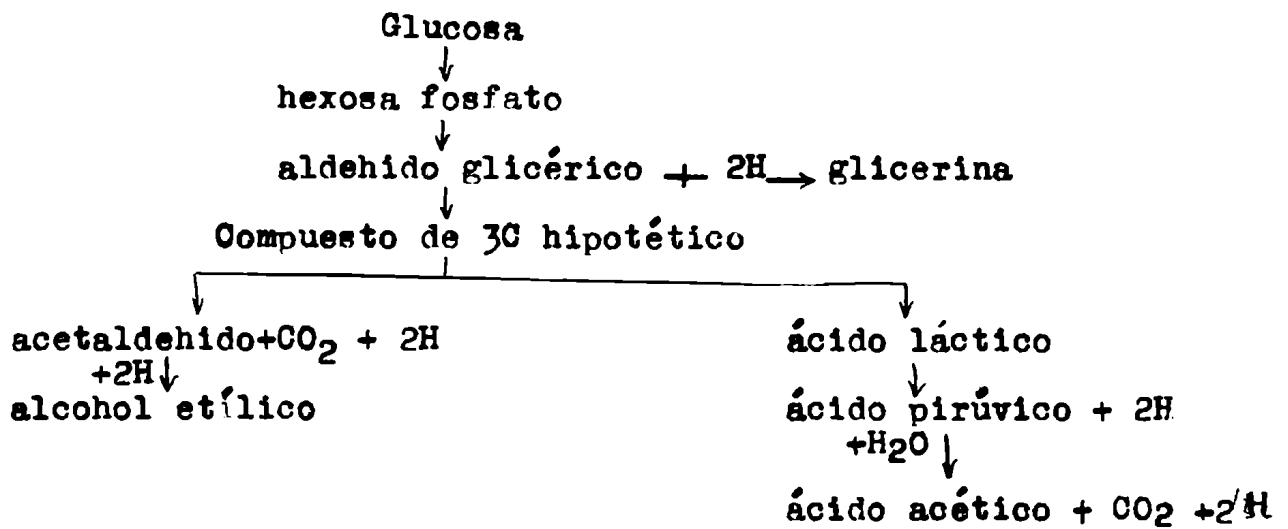
Anteriormente Kluyver (1933) estudiando las fermentaciones lácti-  
cas encontró entre los productos finales glicerina y supuso que ella pro-  
venía de la reducción del aldehído glicérico e de otros productos; esta  
reducción sería debida al hidrogeno activo liberado en la fermentación  
secundaria del ácido láctico.-

En un trabajo realizado tambien por Nelson y Werkman en 1935, es-  
tudiando la fermentación de la glucosa por las bacterias heterofermenta-  
tivas, dichos investigadores sugieren un esquema de fermentación que sir-  
ve para explicar los datos obtenidos por ellos y por otros autores.-

Encontraron como productos finales de la fermentación ácido lácti-  
co, ácido acético, alcohol etílico, anhídrido carbónico y glicerina.-

El esquema de fermentación por ellos sugerido es el que figura a  
continuación.

Las bacterias utilizadas en este trabajo fueron: L.lycopersici,  
L.mannitopeus, y L. acidophil-aerogenes.-



Según este esquema deben producirse dos formas de anhídrido carbónico una equivalente a la cantidad de alcohol etílico y que se forma por descomposición de un hipotético compuesto de tres átomos de carbono, en acetadehido, anhídrido carbónico e hidrógeno activo.-

En la otra forma el anhídrido carbónico es equivalente al ácido acético y se forma por una fermentación secundaria del láctico. Por otra parte la cantidad de glicerina formada será equivalente a dos veces la del ácido acético, puesto que por cada molécula de ácido acético se forman cuatro átomos de hidrogeno activo.-

En 1938 Pederson publica un trabajo sobre las especies productoras de gas del género Lactobacillus y las clasifica en varios grupos.-

Utilizó un gran número de cepas y entre las especies por él estudiadas figuran el L.pentoaceticus, L.lycopersici, L.brevis, L.acidophil-aerogenes, L.fermentum Beijerinck, L.buohneri, L.pastorianus Bergey, etc. etc.-

Demostró que todos ellos producen además de ácido láctico, ácido acético, alcohol etílico y anhídrido carbónico.-

Además observó que en condiciones anaerobicas se produce menos ácido láctico y más ácido acético.-

## II. Métodos de Investigación

### A) Métodos Bacteriológicos

Los métodos bacteriológicos usados en la caracterización de las bacterias empleadas en este trabajo, son los indicados en el "Manual of Methods for Pure Culture Study of Bacteria". (S.A.B.)

#### Morfología

El estudio de la morfología incluye la observación de preparaciones coloreadas para estudiar las formas vegetativas. Como medio de cultivo se utilizó agar estría, la edad del cultivo era de 48 horas y la temperatura usada 37°C. Se coloreó, según la modificación de Kopeloff y Beerman al método de Gram.

#### Movilidad

Se hace un cultivo en gota pendiente y se observa al microscopio, utilizando como medio mosto de cereales.

#### Esporulación

Se toman dos tubos de caldo hígado glucosado, se siembran, y uno de ellos se calienta en un baño de agua a 80°C. Ambos tubos se incuban a 37°C; se observan a las 48 horas y se ve si hay desarrollo en ambos tubos o solo en el que no fué calentado, y en este caso se siguen observando los tubos cada 24 horas durante varios días.

#### Licuasión de gelatina

Se siembra en gelatina en punsión y después de 6 semanas <sup>de incubación</sup>, se coloca el tubo en la heladera, observándose al cabo de un cierto tiempo si hay o no licuasión.

#### Reducción de Nitratos

La reducción de nitratos puede ser indicada por una completa o parcial desaparición del nitrato, acompañado de la aparición de nitritos, amoníaco o nitrógeno libre.- Como medio de cultivo se usa caldo nitrato. La presencia de nitritos es indicada por la formación de un color rojo con el reactivo de



laftilamina y ácido sulfanílico. Un resultado negativo no prueba que no hay reducción, pues ausencia de nitritos en presencia de un buen desarrollo, pueden indicar un consumo completo del nitrato.

Se investiga entonces la presencia de nitratos en el caldo con difenilamina; un color azul, indica la presencia de nitratos, en ausencia de nitritos.

### Formación de SH<sub>2</sub>

El medio de cultivo usado es medio de peptona. En un tubo con dicho medio se coloca en la parte superior, una tirita de papel de filtro, que ha sido previamente mojada en una solución saturada de acetato de plomo. Se siembra, se incuba y se observa. La aparición de un color negro en la tirita, indica la presencia de SH<sub>2</sub>.

### Formación de Indol

El método usado es el de Kovacs. Se siembra en agua de peptona; a alrededor de 10 cc de medio de cultivo se le añaden 5cc de reactivo y se agita, un color rojo indica la formación de indol.

### Rojo de metilo Y Voges-Proskauer

Se siembra en un medio preparado disolviendo 5gr de proteosa peptona y 5gr de glucosa pura y 5gr de PO<sub>4</sub>HK<sub>2</sub> en un litro de agua destilada. Los tubos en este medio se incuban a 37° durante 4 días y luego se agrega a uno, 5ml de rojo de metilo y a otro 5ml de reactivo de VP.

Una reacción positiva de rojo de metilo indica la presencia de suficiente cantidad de ácido, para hacer virar el rojo de metilo.

Una reacción de Voges-Proskauer positiva, indicada por un color rojo esmeralda, significa que se ha formado acetilmetilcarbinol, a partir de la glucosa.

## B) Métodos químicos

Los productos encontrados en la fermentación de la glucosa con las cepas de bacterias utilizadas en este trabajo son: ácido láctico, ácido acético, ácido fórmico, anhídrido carbónico y glicerina. Cada uno de estos productos fué investigado, con excepción del anhídrido carbónico en el líquido que queda después de la fermentación. Se los determinó primero en forma cualitativa y luego cuantitativamente.-

Como medio de cultivo se utilizó agua de levadura autolizada con el 2% de glucosa pura anhidra y el 2% de carbonato de calcio.-

### Disposición de las experiencias

Los métodos y las experiencias se dispusieron de acuerdo al trabajo de Cánepa y de la Serna

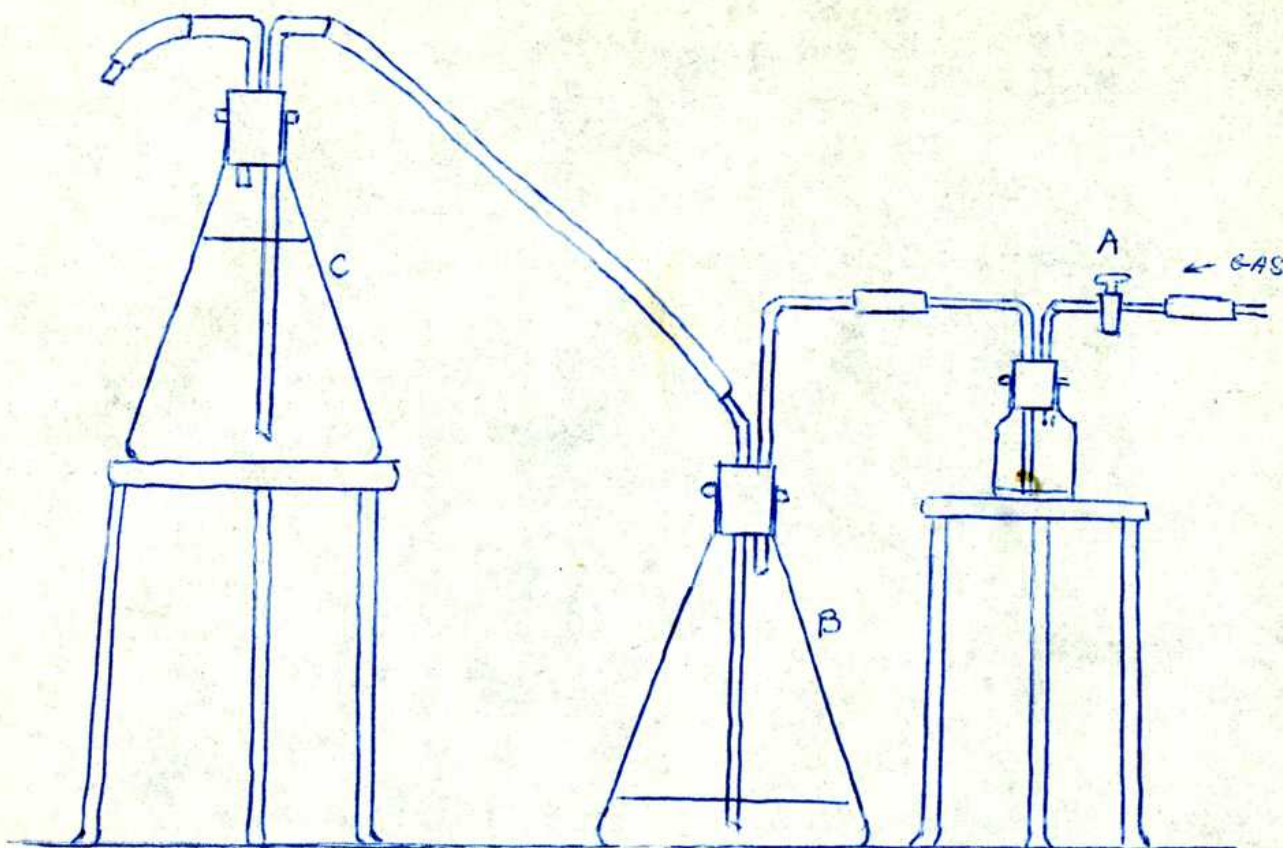
Se esterilizan durante 15 minutos, 1000 cc de medio de cultivo, colocados en un matraz pirex con tapón de goma atravesado por un tubo de decantación y por dos tubos provistos de llaves esmeriladas. Ambos tubos, lo mismo que el embudo de decantación estarán tapados con algodón.-

El tapón con sus tubos y el matraz se esterilizan por separado. Se saca el matraz bien caliente del autoclave, se agita bien para homogeneizar el medio, y se toma una muestra con pipeta estéril, en la cual se determinará exactamente la glucosa. Se adapta al matraz el tapón, tomando las precauciones necesarias para evitar infecciones.-

El tubo de salida se conecta con la trompa de vacío. El tubo de entrada que llega hasta el fondo del matraz, se conecta con un gasómetro, constituido por dos vasos erlenmeyer de dos litros, dispuestos como se ve en la Figura 1, y que contiene nitrógeno lavado para asegurar la ausencia de anhídrido carbónico.-

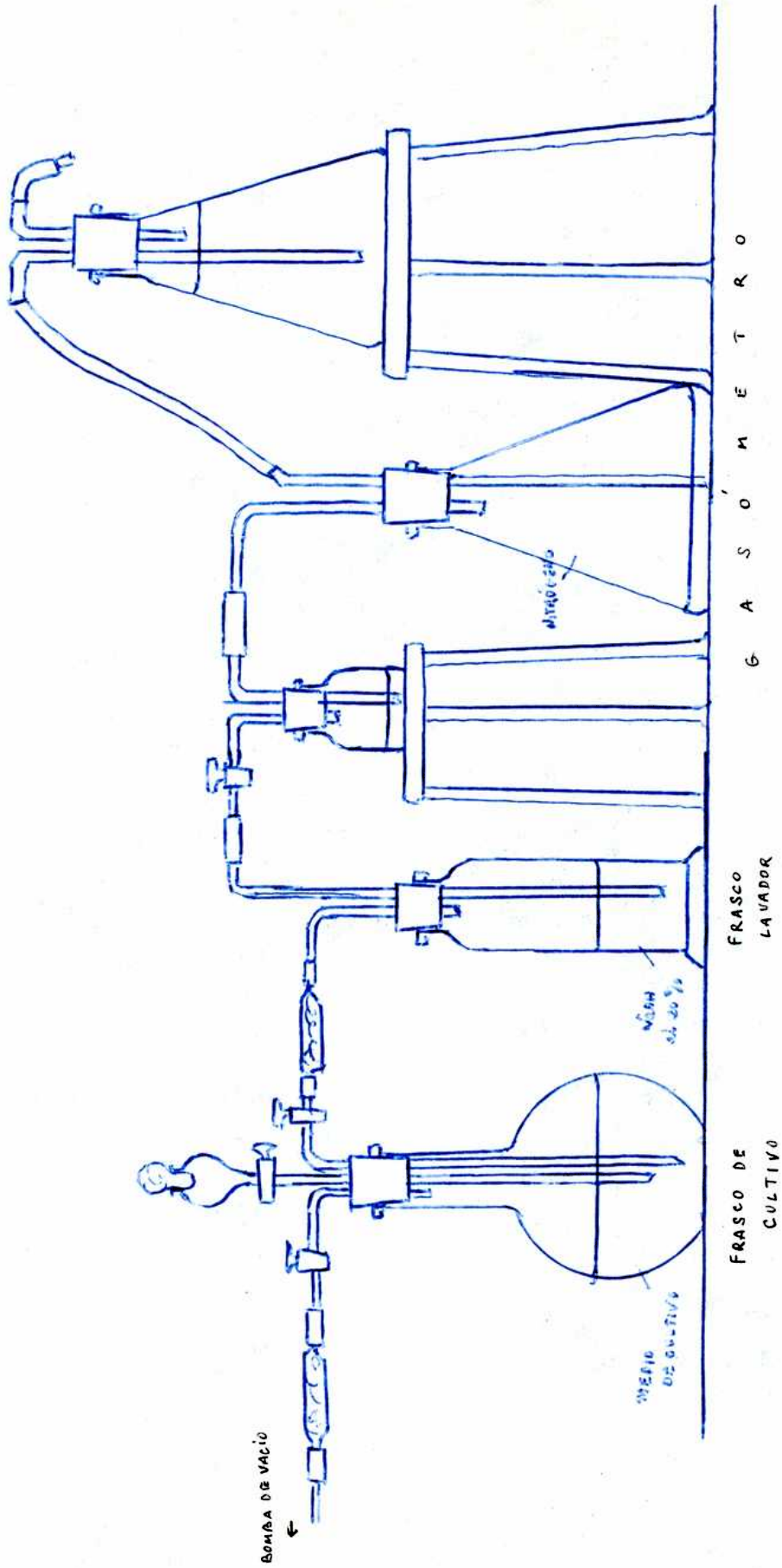
Para ello se intercala entre el gasómetro y el matraz, un frasco lavador que contiene 500cc de una solución de NaOH al 20%.-

Se cierra la llave del tubo de decantación y la del tubo de entrada;



### GASOMETRO

Al comenzar la operación el erlenmeyer B, está lleno de agua y C está vacío. Se conecta por A con el cilindro de nitrógeno, se abre la llave y se hace entrar lentamente el gas en B; el gas, al entrar, desaloja al líquido que llena B, lo hace subir por la goma y luego penetra en C hasta llenarlo. Una vez que B está lleno de gas, se cierra la llave A, y se desconecta el cilindro, quedando el gasómetro en condiciones de ser usado. Para ello basta con abrir la llave A; el líquido que está en C, hace presión sobre el gas, desalojándolo del frasco B y obligándolo a salir por A.



Se abre la del tubo de salida y se hace funcionar la bomba. Cuando hierve el líquido del matraz, se cierra la llave de salida y se abre la de entrada con cuidado, para evitar que el nitrógeno penetre violentamente.

Cuando no entra más nitrógeno se cierra la llave de entrada y se vuelve a abrir la de salida, repitiendo la operación cuatro o cinco veces.-

Por último se deja abierta la de entrada conectada con el gasómetro, para que a medida que se enfría el matraz se vaya llenando de nitrógeno. Cuando está el líquido alrededor de  $37^{\circ}$ , se vierte en el embudo de decantación, una suspensión de cultivo nuevo. Al hacerlo debe tomarse la precaución de cerrar la llave antes de que toda la suspensión haya bajado, para evitar la entrada de aire.-

Se conecta entonces el matraz con tres frascos lavadores que contienen: el primero, 500cc de NaOH al 20%; el segundo 100cc de la misma solución y el tercero que sirve de control con 50 cc. Las conexiones se hacen vidrio sobre vidrio y con goma de vacío. Se lleva todo el aparato a estufa a  $37^{\circ}$ . La fermentación dura alrededor de 10 días para que el consumo de la glucosa sea prácticamente total. El matraz debe agitarse de vez en cuando para que se ponga en suspensión el carbonato de calcio, que debe neutralizar la acidez del medio.-

Cuando la fermentación ha terminado, se desalojan los gases con una cantidad medida de agua esteril, que se introduce por el tubo de decantación. Esto ofrece algunas dificultades pues es preciso vencer la resistencia del líquido en los lavadores. Hecho esto se conecta el aparato con la trompa de vacío, haciendo pasar a través del líquido una corriente libre de aire libre de anhídrido carbónico, para que el  $CO_2$  que está disuelto, se fije en la solución de NaOH. Al sacar el matraz de la estufa conviene cerrar la llave de comunicación con los frascos lavadores, para evitar que se absorba el líquido de los mismos.-

Este método se siguió solamente con uno de los cultivos empleados, la cepa 3001, que es productora de gas. La fermentación se realizó algunas

veces en presencia de nitrógeno y otras llenando el matraz con aire libre  
de anhídrido carbónico, para lo cual <sup>se</sup>dejó entrar simplemente aire, lavando-  
lo previamente con NaOH al 20%. Esto se consiguió haciendo el vacío en el  
matraz, como ya indicamos anteriormente y repitiendo la operación varias  
veces.-

En el caso del otro cultivo, que no es productor de gas, (cepa 23) se  
sembró en vasos erlenmeyer, con tapón de algodón de la manera usual.-

#### a) Métodos Cualitativos

##### anhídrido carbónico

Se utilizó el método de Eldredge indicado en el "Manual of methods".

Se utilizó dicho método con una modificación indicada por el Ing. Agr.  
. Soriano. El método es el siguiente: se coloca en un tubo de ensayo, 1<sup>o</sup>  
cc de medio de cultivo; se cierra con un tapón de goma atravezado por un  
tubo de desprendimiento que va a otro tubo que contiene agua de barita re-  
cien preparada y perfectamente límpida. Se preparan de este modo varios tu-  
bos (alrededor de 12). Los tubos y los tapones se esterilizan por separado;  
antes de colocar los tapones se siembran los tubos con un cultivo de la bac-  
teria que no contenga creta, para que no haya posibilidad de arrastre de la  
misma.-

Los tubos se colocan inclinados en una estufa a 37°, durante 10 días,  
tiempo que dura más o menos la fermentación. Al cabo de ellos se observan  
los tubos con agua de barita y se los compara con los controles, prepara-  
dos de la misma manera pero que no han sido sembrados. La presencia de CO<sub>2</sub>  
se comprueba por el depósito de carbonato de bario. Para mayor seguridad  
conviene titular el agua de barita de los controles y de los tubos con  
1N HCl/10, antes y después de la fermentación. Esto permite además tener  
una idea de la cantidad de CO<sub>2</sub> producido.-

## Glicerina

Se empleó el método de O. Frehdend. Una parte del medio se extrae con éter durante tres días; la extracción se hace en medio alcalino. Terminada esta, se evapora el éter y en el residuo se determina la glicerina.-

Se calienta en un crisol, a alrededor de  $100^{\circ}$  una parte de la sustancia, junto con cristales de ácido oxálico ( $C_2O_4H_2 \cdot 2H_2O$ ); se forma  $CO_2$  que decolora un papel de filtro mojado en una solución de carbonato de sodio y fenolftaleína. Se forma bicarbonato neutro a la fenolftaleína. Se pueden determinar así  $\frac{5}{6}$  de glicerina.-

## Ácidos volátiles

Para separar previamente los ácidos volátiles de los fijos, se empleó el método indicado por Scheffer y modificado por Cánepa y de la Serna.-

Una porción de 100cc del medio previamente filtrado, para separar el exceso de carbonato de calcio, se acidifica con  $SO_4H_2$  N en presencia de timel azul hasta pH 1,6 - 1,7, y se destila con arrastre de vapor de agua hasta recoger alrededor de 1,5 litros.-

Este líquido se neutraliza con NaOH y se evapora hasta unos pocos centímetros; en ellos se investigan el ácido acético y el fórmico.-

## Ácido acético

Se utilizaron para su investigación los métodos indicados por Anderson. Una porción de la sustancia a investigar, se neutraliza y se trata con  $Cl_3Fe$  o con  $(NO_3)_3Fe$  evitando el exceso. Se produce en el líquido un color rojo debido a la formación de acetato férrico. Si se calienta a ebullición el líquido se decolora debido a la descomposición del acetato y se forma un depósito de oxiacetato férrico de color marrón rojizo.-

Otro método consiste en neutralizar el líquido a investigar con NaOH y luego agregar una solución de  $NO_3Ag$ ; se forma un precipitado de acetato de plata, poco soluble en frío y soluble en caliente, que cristaliza fácilmente por enfriamiento en agujas blancas.-

## Ácido fórmico

Se utilizó para su determinación el método indicado por Anderson. Se lo investiga basándose en su poder reductor. Se trata una porción del líquido con una solución de nitrato de plata amoniacal. Se calienta suavemente y en presencia de ácido fórmico se forma un precipitado negro de plata metálica.

## Ácido láctico

El residuo de la destilación por arrastre con vapor de agua, obtenido según se indicó por el método de Scheffer, se extrae con éter durante ocho horas. El extracto etéreo se evapora a sequedad y el residuo se disuelve en alcohol de 95°. Se determina el ácido láctico por el método de Uffelmann. Se trata una porción del líquido a investigar, con un reactivo que se prepara mezclando 10cc de una solución de fenol al 4% con 20cc de agua y añadiendo una gota de  $Cl_3Fe$  al 1%.- El reactivo tiene color amatista que se transforma en amarillo en presencia de ácido láctico.-

Otro método es el de Fletcher y Hopking. Unas pocas gotas de una solución saturada de sulfato de calcio y 5cc de ácido sulfúrico concentrado se agregan a una pequeña cantidad de la solución a investigar. Se calienta a baño María dos horas; se enfría y se agregan dos gotas de solución diluida de tiófene. La presencia de ácido láctico se nota por la formación de un color rojo cereza, cuando el tubo se vuelve a colocar en agua caliente.-

## 2) Métodos Cuantitativos

### Glucosa

Para saber exactamente la cantidad de glucosa transformada en el proceso de fermentación, es necesario determinarla antes y después de la misma. La cantidad agregada al medio, se determina en la muestra sacada después de la esterilización. En un balón aforado de 100cc se coloca 1cc de medio cuidadosamente medido y se agrega 1cc de solución de sulfato de zinc y 1cc de  $NaOH$  0,5N (método de Somogyi). Se lleva a 100cc con agua destilada, se agita y se filtra. Esta operación se realiza con el objeto de defecar.-



Para la determinación se usó el método de Shaffer y Hartmann utilizando el microreactivo cúprico. Este reactivo se prepara disolviendo 40gr de carbonato de sodio anhidro en 400cc de agua destilada caliente. Se le agrega con agitación 5gr de sulfato de cobre y 7,5grs de ácido tartárico disueltos en 150cc de agua. Aparte se disuelven en 250cc de agua destilada 0,7grs de yodato de potasio, 10grs de IK y 18,4grs de oxalato de potasio y se agregan a la solución anterior. Se enfría y se diluye a 1 litro.-

El método se aplica como sigue: se miden 5cc de reactivo y se colocan en un tubo grande; se añade igual volumen de la solución de azúcar (no debe contener más de 2mgrs de glucosa). Se cubre el tubo y se calienta sobre llama pequeña 2 minutos o en bañomaria hirviendo 15 minutos. Se enfría bajo canilla algunos minutos y se añaden 5cc de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  N y después de un minuto se titula con tiosulfato de sodio N/200 o sea 0,005N.-

Este tiosulfato se prepara en el momento de usar diluyendo una solución N/10. Simultáneamente se hace una titulación en blanco calentando el reactivo con igual cantidad de agua; se usa almidón como indicador.-

La diferencia entre la titulación en blanco y la determinación anterior representa el Cu reducido.-

1cc de tiosulfato 0,005 N = 0,318 mgrs de Cu

La cantidad de glucosa está dada en la tabla que figura en el trabajo original.-

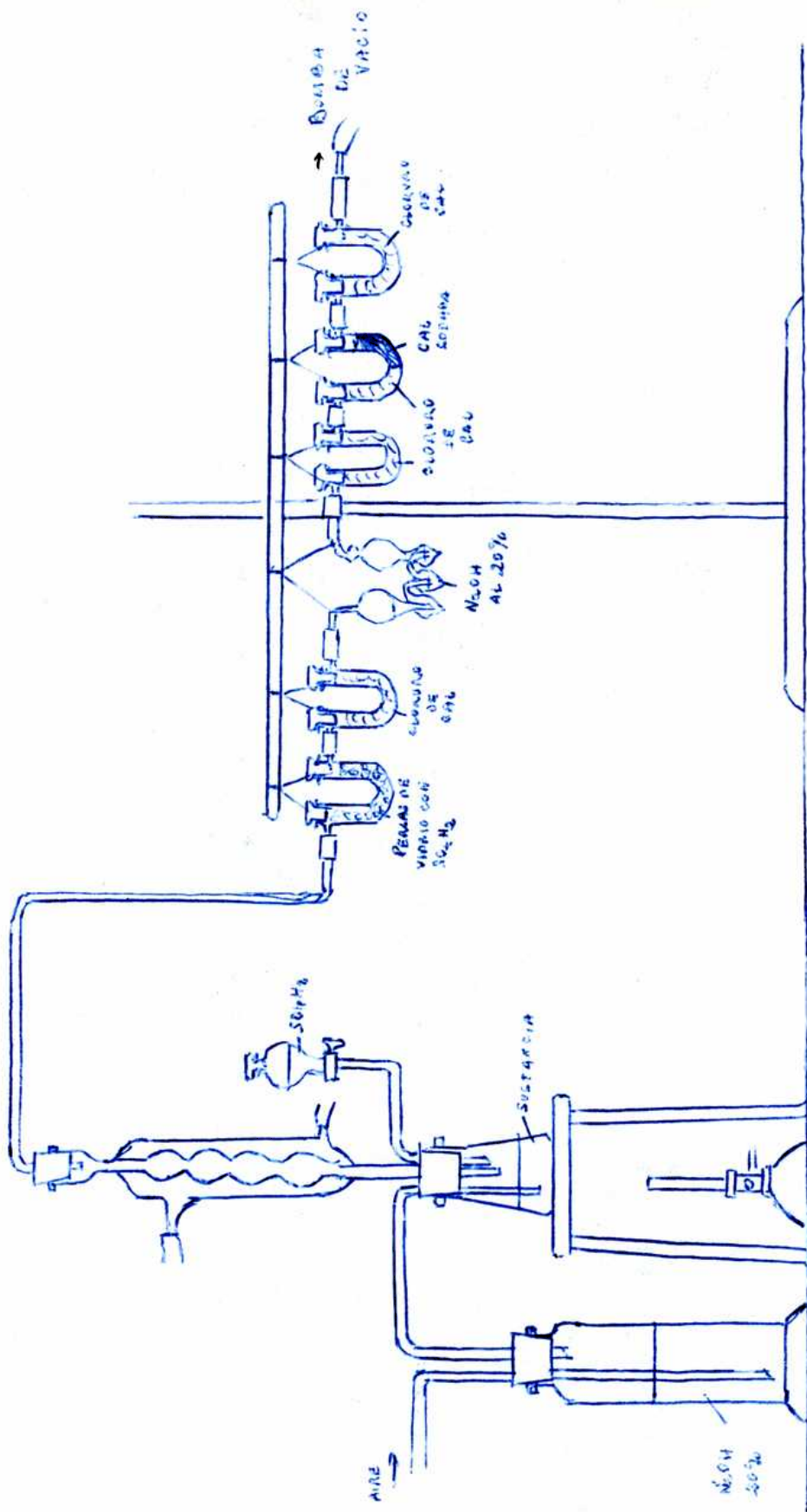
La glucosa restante del medio después de la fermentación se determina de una manera análoga.-

#### Anhidrido carbónico

El  $\text{CO}_2$  que es fijado por el NaOH es producido no solo por las bacterias, sino también por la descomposición del carbonato de calcio que es atacado por los ácidos que se forman en la fermentación.-

Se utilizó para determinar el  $\text{CO}_2$  el método de Brank. Por dicho método pueden conocerse la cantidad de  $\text{CO}_2$  total, libre y combinado como carbonato del medio, antes y después de la fermentación.-

Si llamamos A al  $\text{CO}_2$  del medio después de la fermentación y B al  $\text{CO}_2$



APARATO PARA ABSORBER CO<sub>2</sub>

antes de la fermentación, B-A será el CO<sub>2</sub> desprendido por el carbonato de calcio agregado al medio. La cantidad de CO<sub>2</sub> desprendido la conoceremos titulando el NaOH de los lavadores, antes y después de la fermentación. A esa cantidad la llamaremos B-A+C, siendo C el CO<sub>2</sub> desprendido por las bacterias. Con estos datos podemos conocer C.

Para determinar el CO<sub>2</sub> total se utilizó el método de Classen, usando el aparato que se ve en la figura.-

Se hace pasar a través del mismo durante media hora una corriente de aire libre de CO<sub>2</sub> y luego se conecta el aparato de absorción y el tubo testigo que han sido previamente tarados. Se agita bien para que sea homogénea la muestra sacada antes de la fermentación y se miden 25cc de la misma que se vierten en el erlenmeyer por el embudo tratando de que no entre aire. Se lava el embudo varias veces con agua destilada, para que no quede carbonato de calcio adherido a las paredes y luego se agrega SO<sub>4</sub>H<sub>2</sub> diluido al 1/3, haciendo pasar simultáneamente una corriente de aire libre de anhídrido carbónico. El ácido se agregará de tal modo que en el tubo de Mohr pasen de dos a tres burbujas por segundo. Cuando el desprendimiento es ya lento, se calienta el erlenmeyer con cuidado hasta principio de ebullición; después de 45 minutos todo el carbonato ha sido atacado, pero la corriente de aire sin CO<sub>2</sub> no se interrumpe hasta completar las dos horas.-

Se vuelve entonces a pesar el tubo de absorción y el testigo.-

El CO<sub>2</sub> fijado por la solución de NaOH de los lavadores se determina por el método de Winkler, valorando en 5cc de la solución diluida, el álcali total con ClH N y naranja de metilo como indicador. En otra porción se determina la alcalinidad correspondiente al NaOH, luego de precipitado el carbonato con exceso de Cl<sub>3</sub>Ba y usando fenolftaleína como indicador.-

El CO<sub>2</sub> total del medio después de la fermentación se determina de la misma manera que hemos indicado anteriormente.-

Todas las determinaciones conviene comenzarlas el mismo día en que

se saca el aparato de la estufa para evitar que sufra modificaciones el medio.-

Una vez desalojado el CO<sub>2</sub> disuelto, se destapa el matraz, se agita y se vierte el medio fermentado en un erlenmeyer de capacidad adecuada, lavando el matraz con una cantidad pequeña y conocida de agua destilada.-

25cc del medio bien agitados, se destinan a la determinación del CO<sub>2</sub> que conviene hacer enseguida, pues debido a la acidez del medio continúa desprendiéndose CO<sub>2</sub>.-

Alrededor de 300cc. se destinan a la determinación de los ácidos. Se calientan durante 15 minutos con refrigerante a reflujo, se enfría y se filtra en un Buchner con pasta de papel. Se mide el volumen filtrado y se usa una parte alícuota del mismo para determinar los ácidos y el resto acidificado a pH 1,7 se guarda en la heladera por si fracasa alguna determinación.-

Lo que queda del medio fermentado se filtra al vacío en un Buchner con pasta de papel y se mide el volumen filtrado. De esto se separan 10cc que se utilizan para determinar la glucosa y en el resto se determina la glicerina.-

#### Acidos volatiles

Se usó la técnica indicada por Scheffer y modificada por

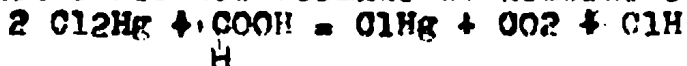
#### Cánepa y de la Serna.-

100cc de la muestra se acidifican con ácido sulfúrico normal hasta pH 1,7 usando timol azul como indicador y procediendo por toque. Se ensaya primero con una pequeña cantidad de líquido. Se coloca la muestra a analizar en un balón Kjeldahl, en la parte superior del cual se pone un tubo Kjeldahl, porque a veces se produce mucha espuma. Se opera por arrastre con agua libre de CO<sub>2</sub>. Se regula la operación de tal modo que pasen de 40 a 45 gotas por minuto. Se recogen alrededor de 1,5 litros. El destilado se trata con NaOH N/10 en presencia de fenolftaleína hasta color rosa persistente; se concentra enseguida a 50-60cc y se determina el exceso de NaOH con ClH o mejor se titula por retorno con NaOH N/10.-

Mientras se enfría, para evitar que el NaOH se carbonata, se tapa el frasco con un tapón atravesado por un tubo largo doblado en U, en la parte superior del cual se adapta un tubito con cal sodada.-

### Ácido Fórmico

Se usó para su determinación el método de Fincke. El líquido concentrado y neutro se pasa a un vaso de precipitado y se le añaden 10cc de un reactivo formado por una solución que contiene 10% de bicloruro de mercurio, 3% de ClNa y de 3 a 5% de acetato de sodio. Se deja durante dos horas en bañomaria y se filtra en caliente; se lava el precipitado con agua-alcohol-eter y se seca en estufa a 100° durante una hora. El peso del calomel da la cantidad de ácido fórmico formado de acuerdo con la ecuación:



La diferencia entre la caidez volátil y la correspondiente al ácido fórmico se considera debida al ácido acético.-

### Ácidos no volátiles

En este caso están constituidos exclusivamente por ácido láctico. Se utiliza para su determinación el residuo de la destilación por arrastre, que se usó para determinar ácidos volátiles. Se siguió la técnica indicada por Ballet.-

Para neutralizar el residuo con los ácidos fijos se usó el método de Bertrand; se neutraliza este residuo con NaOH añadiendo un exceso determinado del mismo y utilizando fenolftaleína como indicador. Se calienta cerca de ebullición durante cinco minutos, se enfría, se añade un exceso determinado de ácido sulfúrico normal y se neutraliza con NaOH. Luego se concentra sobre bañomaria en capsula chica, hasta consistencia siruposa (3 o 4 cc) y se acidifica con  $\text{SO}_4\text{H}_2$  al 1/3 en cantidad equivalente al NaOH usado en la neutralización. Se agrega entonces, mezclando intimamente, sulfato sodio anhidro y arena calcinada, formando una pasta que se deja reposar hasta que el sulfato cristalice. Se pulveriza esa masa sólida y se extrae con eter en un Soxhlet durante ocho horas.-

El extracto etéreo, de acuerdo con Scffer, se evapora totalmente y el residuo se disuelve en alcohol, llevando la solución a volumen conocido,

50cc en este caso. Una parte alícuota de ella se titula con NaOH N/10 actuando por retorno.-

### Glicerina

Se usó para su determinación el método de Schoorl.-

La determinación de la glicerina es difícil debido a la necesidad de separar las sustancias que se encuentran en el medio de cultivo y que pueden molestar. Se extrajo la glicerina del medio del cultivo siguiendo la técnica indicada por Nelson y Wekman.-

Una parte alícuota del medio se evapora hasta 1 cc y se le agrega NaOH en una cantidad suficiente para asegurar que la extracción sea alcalina.- La solución se trata con sulfato de sodio y arena calcinada y se deja cristalizar el sulfato. Se extrae en un Soxhlet, con eter, durante 72 <sup>que</sup> horas para la separación sea cuantitativa. El extracto etéreo se evapora. el residuo se disuelve en agua destilada, en un volumen conocido, y se determina la glicerina por el método de Schoorl. Se colocan 10 cc de muestra que no contengan mas de 500 mgr de glicerina en un erlenmeyer y se añaden 10 cc de NaOH 7,5 N y 60 cc de alcohol metílico. Luego se añade solución alcoholica de  $\text{Cl}_2$  igual 10% hasta que no se forme más precipitado, y entonces se vuelve a agregar otra vez igual cantidad. Se enfría a temperatura ambiente,-y se lleva a 100 cc con metanol. Se centrifuga y el liquido sobrenadante se decanta haciendo sifon. Se evapora el líquido a unos pocos centímetros, cuidando de que el alcohol metílico sea completamente eliminado. Se añaden entonces de 8 a 10 cc de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  4N, 1 gr de IK y 10 cc de agua destilada. Se titula con tiosulfato de sodio 0,1 N y almidón como indicador.-

1 cc de tiosulfato 0,1 N = 9,2 mgrs de glicerina.-

### III.- Resultados Obtenidos

#### A) Resultados de las Investigaciones Bacteriológicas

Las características de las dos cepas de Lactobacillus estudiadas en este trabajo son las siguientes:

1) Lactobacillus acidophilus: Origen: Colección del Instituto Lister (Londres). Cepa No. 23 de la colección del Instituto Nacional de la Nutrición.- Proviene de materia fecal de niño.-

#### Morfología

##### Formas Vegetativas

Medio usado: mosto de cereales con creta.- Temp.: 37° Edad: 48 horas

Formas: bastones largos, filamentosos

Extremos: redondeados.

Movilidad: no móviles.

Esporulación: no esporulan.

Gram positivos.

Forman cadenas.

#### Cultivos

Colonias en placa de agar hígado Temp.: 37° Edad: 48 horas

Forma: circulares, algunas con ramificaciones.

Superficie: rugosa, con aspecto algo moire.

Borde: ondulado.

Elevación de crecimiento: elevadas.

Incoloras y transparentes.

Colonias en agar hígado glucosado en punsión Temp.: 37° Edad: 48 horas

Crecimiento: escaso.

Forma: circulares i lenticulares.

Agar de aspecto lechoso.

Colonias en agar hígado en estria Temp.: 37° Edad: 48 horas

Crecimiento: escaso.

Colonias pequeñas y transparentes.

Superficie: ondulada con ramificaciones y mechones.

Saldo hígado Temp.: 37° Edad: 48 horas

Crecimiento en superficie: no forma película.

Enturbiamiento: ligero y uniforme.

Sedimento: no forma.

Reacción en punsión Temp.: 37°

Crecimiento: escaso y uniforme.

Línea de punsión: filiforme.

Liquefacción: no se observa.

Reducción de nitratos: negativa

Formación de indol: negativa

Formación de SH<sub>2</sub>: negativa

Coche: coágulo compacto sin separación de suero.

Catalasa: negativa

Producción de gas: no forma gas.

Reacción de metilo: positivo

Reacción-Proskauer: negativo

### Fermentación de azúcares

Medio: medio básico de digestión de caseína con púrpura de bromo cresol.

<u>Monosacáridos</u>	<u>Disacáridos</u>	<u>Polisacáridos</u>
glucosa +	lactosa +	almidón -
fructosa -	sacarosa +	inulina +
arabinosa -	maltoza +	dextrina -
<u>Polialcoholes</u>	<u>Glucósidos</u>	
glicerina -	salicilina +	
manita +		

La fermentación en los casos positivos se produjo a las 24 horas. Los tubos en los que no se notó la fermentación se mantuvieron en observación hasta 8 días después de sembrados.-



2) Lactobacillus aislado de vagina humana en el Instituto Nacional de la Nutrición por la Dra. M.S. Cataidi. Cepa No. 3001 de la colección del Instituto.

### Morfología

#### Formas Vegetativas

Medio usado: mosto de cereales con creta. Temp.: 37° Edad: 48 horas

Formas: bastones cortos y medianos.

Extremos: redondeados.

Movilidad: no móviles.

Esporulación: no esporulan.

Gram positivos.

Forma cadenas o se dispone de a pares formando V

### Cultivos

Colonias en placa de agar hígado temp.: 37° Edad: 48 horas

Forma: redondeadas, algunas ramificadas.

Superficie: muy rugosa.

Borde: muy irregular y ramificado.

Elevación de crecimiento: elevadas.

Algunas colonias son transparentes y otras opacas.

Colonias en agar hígado glucoado en punsión Temp.: 37° Edad: 48 horas

Crecimiento: escaso.

Forma: redondeadas.

Colonias en agar hígado en estria Temp.: 37° Edad: 48 horas

Desarrollo muy escaso.

Colonias muy pequeñas.

Bordes lobulados.

Caldo hígado Temp.: 37° Edad: 48 horas.

Crecimiento en superficie: no forma película.

Enturbiamiento muy ligero y uniforme.

Sedimento: no forma.

## Gelatina en punsi3n

No crece.

Reducci3n de nitratos: negativa

Formaci3n de indol: negativa

Formaci3n de SH<sub>2</sub>: negativa

Leche: acidifica pero no coagula.

Catalasa: negativa

Producci3n de gas: produce gas en mosto de cereales.

Rojo de metilo: positivo

Voges-Proskauer: negativo.

## Fermentaci3n de Azúcares

Medio: medio básiico de digesti3n de caseína con púrpura de bromocresol.

<u>Monosacáridos</u>	<u>Disacáridos</u>	<u>Polisacáridos</u>
glucosa + (6)	lactosa + (6)	almid3n -
xilosa -	sacarosa + (4)	inulina -
arabinosa + (1)	maltosa + (6)	dextrina -
<u>Polialcoholes</u>	<u>Gluc3sidos</u>	
glicerina -	salicilina -	
manita -		

Los números entre parentésis indican el número de días necesario para que el azúcar fermente. Todos los tubos se incubaron hasta después de 8 días de sembrados.-

## B) Resultados de las Investigaciones

### Químicas

De acuerdo con las técnicas descriptas, se estudió el proceso de la fermentación de la glucosa por las cepas mencionadas.-

Los resultados obtenidos figuran en los cuadros que se dan a continuación:

Experiencias realizadas con el Lactobacillus Acidophilus, cepa Nº 23 no gasógena.-

#### Cuadro Nº 1

Medio: Agua de levadura con el 2% de glucosa y el 2% de carbonato de calcio.- Temperatura: 37º Tiempo de fermentación: 10 días. L. Acidophilus

sustancias	grs	% de la glucosa fermentada.
glucosa añadida	1,782	
glucosa residual	0,01	
glucosa fermentada	1,772	100
ácidos volátiles como a. acético	0,043	3,5
ácido láctico	1,650	95,5
		97,0 %

Quadro Nº 2

Medio: agua de levadura con el 2% de glucosa y el 2% de carbonato de calcio.- Temperatura: 37º. Tiempo de fermentación: 10 días. L.acidophilus cepa Nº 23 no gasógena.-

sustancias	gr %	% de la glucosa fermentada
glucosa añadida	2,023	
glucosa residual	0,021	
glucosa fermentada	2,012	100
ácidos volátiles como ácido acético.	0,054	4
ácido láctico	1,936	95,6
		99,6

Quadro Nº 3

L.acidophilus, cepa Nº 23 no gasógena.- Medio: agua de levadura con el 2% de glucosa y el 2% de carbonato de calcio.- Temp.: 37º Tiempo de cultivo: 10 días.-

sustancias	gr %	% de glucosa fermentada
glucosa añadida	2,030	
glucosa residual	0,03	
glucosa fermentada	2,00	100
ácidos volátiles como ácido acético	0,045	3,5
ácido láctico	1,830	95,0
		98,5 %

Cuadro N° 4

L. Acidophilus, cepa N° 23 no gasógena.- Medio: agua de levadura con el 2% de glucosa y el 2% de carbonato de calcio.-

Temperatura de fermentación: 37° Tiempo de fermentación: 10 días.-

sustancias	gr%	% de glucosa fermentada
glucosa añadida	1,80	
glucosa residual	0,01	
glucosa fermentada	1,79	100
ácidos volátiles como a. acético	0,045	3,2
ácido láctico	1,72	96,0
		99,2

Estas fermentaciones se realizaron sin investigar, en los ácidos volátiles, la presencia de ácido fórmico, pues debido a su escasa cantidad era muy difícil determinarlo cuantitativamente.-

A fin de poderlo determinar, se realizaron además de esas determinaciones, dos más, con mayor cantidad de medio.-

En la investigación de los ácidos volátiles se utilizó entonces, 800 cc. en lugar de los 100 cc. que se usaban habitualmente.-

Se pudo de este modo determinar el ácido fórmico, recogiendo 12 litros de destilado, y usando el método indicado anteriormente.-

Los resultados obtenidos son los que figuran en los cuadros dados a continuación:

Cuadro Nº 5

L. acidophilus, cepa Nº 23 no gasógena. Medio: agua de levadura con el 2% de glucosa y el 2% de carbonato de calcio.-Temp. 37º.- Tiempo de fermentación: 10 días.-

sustancias	gr%	% de glucosa fermentada	% Moles de sustancia por 50 moles de glucosa fermentada	
			ác. acético	ác. fórmico
glucosa añadida	1,675			
glucosa residual	0,015			
glucosa fermentada	1,660	100		
ácido acético	0,031	1,86	2,8	—
ácido fórmico	0,0185	1,12	—	2,2
ácido láctico	1,595	96,	96,4	96,4
		98,98	99,2	98,6

Cuadro Nº 6

L. acidophilus, cepa Nº 23, no gasógena. Medio: agua de levadura con 2% de glucosa y 2% de CO<sub>2</sub>. Temperatura: 37º. Tiempo de fermentación: 10 días.

sustancias	gr%	% de glucosa fermentada	Moles de sustancia por 50 moles de glucosa fermentada	
			ác. acético	ác. fórmico.
glucosa añadida	1,66			
glucosa residual	0,01			
glucosa fermentada	1,650	100		
ácido acético	0,030	1,78	2,75	—
ácido fórmico	0,018	1,15	—	2,14
ácido láctico	1,581	96,0	96,0	96,0
		99,2	98,75	98,14

2)) Experiencias realizadas con el Lactobacillus aislado de vagina, cepa  
 N° 3001, gasógena.-

Quadro N° 7

Lactobacillus aislado de vagina, cepa N° 3001, gasógena.-

Medio: agua de levadura, con 2% de glucosa y 2% de carbonato de calcio.-

Temperatura: 37°. Tiempo de cultivo: 10 días.

Esta fermentación se realizó en presencia de aire.-

sustancias	gr%	%de gluco- sa ferm.	mM por litro	Moles de sustancia por 50 moles de glu- cosa fermentada.
glucosa añadida	1,66			
glucosa residual	0,01			
glucosa fermentada	1,65	100,	92,	
ácido acético	0,061	3,7	10,1	5,45
anhídrido carbónico	0,040	2,5	9,9	4,94
ácido lá- ctico	1,350	81,5	151,	81,
glicerina	0,169	11,0	18,7	10,6
		98,7		101,97

Quadro N° 8

Lactobacillus aislado de vagina, cepa N° 3001, gasógena.

Medio: agua de levadura con 2% de glucosa y 2% de carbonato de calcio.-

Temperatura: 37°. Tiempo de fermentación: 10 días.-

sustancias	gr%	%de glucosa ferm.	mM por litro	Moles de sustancia por 50 moles de glucosa fermentada.
glucosa añadida	1,64			
glucosa residual	0,005			
glucosa fermentada	1,635	100,0	91,5	
ácido acético	0,059	3,5	9,8	5,4
anhídrido carbónico	0,04	2,4	9,9	4,94
ácido láctico	1,355	82,5	151,0	81,0
glicerina	0,165	10,5	18,0	10,0
		98,9		101,34

Quadro Nº 9

Lactobacillus aislado de vagina, cepa Nº 3001, gasógena.-Medio: agua de levadura con 2% de glucosa y 2% de CO<sub>2</sub>. Temp.: 37°. -Tiempo de ferm: 10 días

sustancias	gr%	%de glucosa ferm.	mM por litro	Moles de sust. por 50 moles de gluc. ferm.
glucosa añadida	1,66			
glucosa residual	0,008			
glucosa fermentada	1,642	100,0	92,0	
ácido acético	0,059	3,5	9,8	5,4
anhídrido carbónico	0,049	2,9	10,2	6,5
ácido láctico	1,350	83,	151,	81,6
glicerina	0,163	10,0	18,	10,0
		99,4		103,5

Esta fermentación se realizó en presencia de nitrógeno.-



Quadro Nº 10

Lactobacillus aislado de vagina, cepa Nº 3001, gasógena. Medio de cultivo: agua de levadura con 2% de glucosa y 2% de carbonato de calcio.-

Temperatura: 37°. Tiempo de fermentación: 10 días.

Esta fermentación se realizó en presencia de nitrógeno.-

sustancias	gr%	%de gluco- sa ferm.	mM por litro	Moles de sustancia por 50 moles de glu- cosa fermentada.-
glucosa añadida	1,66			
glucosa residual	0,08			
glucosa fermentada	1,58	100	88	
ácido acé- tico	0,05	3,1	8,3	4,73
anhidrido carbónico	0,035	2,2	8,1	4,47
ácido láctico	1,380	84,2	153,0	85,0
glicerina	0,047	9,5	16,0	9,1
		99,0		103,30

#### IV.- Discusión de los Resultados

Los resultados obtenidos con las dos cepas de Lactobacillus estudiadas son distintos. La cepa No.23 es un típico Lactobacillus acidophilus y como tal produce casi exclusivamente ácido láctico/. Además de este , da una pequeña cantidad de ácidos volátiles , constituidos por los ácidos acético y fórmico, los cuales podrían provenir de una transformación posterior del ácido láctico , de acuerdo a lo sugerido por diversos autores.

En el estudio de la cepa No.3001 se encontraron como productos finales de la fermentación de la glucosa, anhídrido carbónico, ácidos acético y láctico y glicerina, lo cual concuerda con el esquema de Nelson y Werkman.

El ácido acético según los citados autores , puede provenir de una transformación secundaria del ácido láctico con formación de un producto intermedio, el ácido pirúvico, el cual a su vez se transformaría en el ácido acético, anhídrido carbónico e hidrógeno activo que actuaría como reductor. Este hidrógeno reduciría al aldehído glicérico? produciendo glicerina que se encuentra entre los productos de fermentación.

De los resultados que se observan en las tablas del presente trabajo se puede deducir , puesto que en este caso no se encontró alcohol etílico, que la cantidad de anhídrido carbónico formada es equivalente a la de ácido acético, lo cual está de acuerdo con una de las interpretaciones del esquema de los citados autores. Por otra parte la cantidad de glicerina encontrada es aproximadamente equivalente a dos veces la cantidad de ácido acético lo cual concuerda también con dicho esquema.

Por ejemplo en el cuadro No.10 vemos que para 8,3mM de ácido acético, se formaron 8,1 mM de CO<sub>2</sub> y 16 mM de glicerina/. Las cantidades de CO<sub>2</sub> y de ácido acético son bastante aproximadas.

De estos resultados podemos concluir que la cepa No. 3001 se comporta como heterofermentativa.

## V. Conclusiones

El L. acidophilus produce en la fermentación de la glucosa, además de ácido láctico, pequeñas cantidades de ácidos acético y fórmico; en consecuencia de acuerdo con *Klüyver y Donker*, se comporta como una bacteria homofermentativa. Los ácidos acético y fórmico, provendrían de una transformación secundaria de ácido láctico, según lo sugerido por diversos autores.

El otro Lactobacillus estudiado, es una bacteria heterofermentativa, que además de ácido láctico, produce anhídrido carbónico, ácido acético y glicerina. Estos tres últimos parecen provenir de una ruptura posterior del ácido láctico, explicable por medio del esquema de Nelson y Werkman.

En los resultados obtenidos, en la fermentación de la glucosa por ambas cepas, no se observaron diferencias, utilizando en el frasco de cultivo, sobre el medio, atmósfera de aire o de nitrógeno.

Del comportamiento tanto químico como bacteriológico, de las dos cepas estudiadas, se puede deducir, que se trata de dos especies diferentes. Por lo tanto, una de las dos formas de Lactobacillus aisladas de vagina, formadora de gas con los hidratos de carbono, no corresponde a la especie L. acidophilus como fué sugerido por Cataldi, en un trabajo anterior, basándose en los caracteres de cultivo.

## VI. Resumen.

Se realizó un estudio del metabolismo hidrocarbonado del L. acidophilus proveniente de materia fecal de niño, conservada en colección, y de otro representante del mismo género, aislado de vagina humana, efectuando simultáneamente un estudio bacteriológico de dichas especies, a objeto de controlar sus características.

Como productos finales de la fermentación se encontraron, en el caso del L. acidophilus, los ácidos láctico, acético y fórmico.

Los productos finales de la fermentación de l. glucosa por el Lactobacillus gasógeno aislado de vagina humana, fueron: ácidos láctico y acético, anhídrido carbónico y glicerina. Para explicar la formación de estos tres últimos se adoptó el esquema dado por Nelson y Werkman.

De acuerdo a la denominación de Kivvyer y Donker la cepa L. acidophilus estudiada en este trabajo corresponde a una bacteria homofermentativa y la cepa gasógena aislada de vagina a una heterofermentativa.

## VI. Bibliografía

- Anderson C.G. "Introduction to bacteriological Chemistry" 260.(1938)
- Anderson A. and Werkman C.H. "Lactic acid fermentation" J.Bact. 35:69(1938)
- Berto C. and Glück M. Ann. der Chemie 495:139-146.(1932)
- Breden C.R. and Fulner E.I. "The chemical action of Aerobacter faeni on xylose and sucrose" Iowa State College J.Sci. 5:133-138 (1930).
- Bellet M.A. Nouvelle methode de dosage de l'acide lactique. Bull.Soc Chim. 13:565 (1913)
- Bertrand G. Guide pour les manipulations de chimie biologique.Paris(1913)
- Cataldi M.S. y Biondini P. "Microflora del ambiente vaginal de la madre en relación con la microflora del recién nacido". El día médico. Año XIX N<sup>o</sup>9.
- Charleton A. and Nelson M.E. ,Werkman C.H. Iowa State College 9:1(1934)
- Curran H., Roger L. and Whittier E. "The distinguishing characteristics of L.acidophilus" J.Bact. 25:595(1933).
- Cánepa D. y de la Serna C.S. "Fermentación de la glucosa por bacterias del grupo coli-aerógenes". Revista del Instituto Bacteriológico del Departamento Nacional de Higiene. 7:297-350 (1936).
- Frehndend O. "Detection of glycerol" Mikrochim.Acta. 2:20 (1937).
- Fornachon J., Douglas H. and Vaughn R. J.Bact. 39:84-86.(1940)
- Fred E.B., Peterson W.H. and Davenport. Jour.Biol.Chem.42:175.(1920).
- Gunsalus I.C. and Niven C.F. "The effect of pH on the lactic acid fermentation" Jour.Biol.Chem. 145:131-135 (1942).
- Gayon U. ,Dubourg E. Ann.Inst.Pasteur 15:527 (1901).
- Hunt G.A. "The gaseous metabolism of L.pentoacetious with reference to several representative members of Lactobacillus group" J.Bact. 26:341(1933)
- Hunt G.A. and Rettger L.F. "A comparative study of members of the Lactobacillus group with special emphasis on Lactobacilli of soil and grain" J.Bact. 20: 61 (1930).
- Kluyver A.J. Donker H.J.-Proc Akad.V.Wetenschappen.Amsterdam I.28:274-313(1924).

- Kayser A. Ann.Inst.N at. Agron. Sci. 3:214 (1904)
- Longworth L.G. and MacInnes D.A. "Bacterial growth at constant pH".  
J.Bact. 32:567-585 (1936). J.Bact. 29:595 (1935). J.Bact. 30:547 (1935).
- Montagna C.P. y Cataldi M.S. "Sobre la presencia de L.bifidus en el meconio y en el ambiente vaginal de la madre". Revista de la asociación Argentina de Dietología. 7:47 (1944).
- Nelson M.E. and Werkman C.H. "Disimilation of glucose by heterofermentative lactic acid bacteria". J.Bact. 30:547-557 (1935).
- Pederson C.S. New York State Agri. Exp. Tech. Bull. 150:151 (1938).
- Pederson C.S. "The gas producing species of genus Lactobacillus". J.Bact. 35:95 (1938).
- Pederson C.S., Peterson W.H. and Fred E.B. "The forms of lactic acid produced by pure and mixed cultures of bacteria". Jour. Biol. Chem. 68:151- (1926).
- Peterson W.H. and Fred E.B. Jour. Biol. Chem. 42:172-173 (1920).
- Rettger L. and Weinstein L. X "Biological and chemical studies of Lactobacillus genus with special reference to xylose fermentation by L.pentosecticus". J.Bact. 24:1 (1931).
- Scheffer M.A. De suikervergisting door bacteriën der Coli groep. Dis Delft. (1928)
- Schoorl O.N. "Determination of glycerol". Pharm. Weekblad 76:777 (1939).
- Stern R.M. and Frazier W.C. "Physiological characteristics of lactic acid bacteria near the maximum growth temperature". J.Bact. 42:479-483 (1941)
- Tracy R.L. "A comparative study of metabolism of R and S variants of L.plantarum". J.Bact. 36-476 (1938).
- Kendall A. and Haner R. "Bacillus acidophilus". Studies in bacterial metabolism. Jour. Inf. Dis. 35:89-103 (1924).