Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis de Posgrado

Acetilmetilcarbinol : producción, investigación y determinación

Goldemberg, Sara Hebe

1951

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. 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. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Goldemberg, Sara Hebe. (1951). Acetilmetilcarbinol : producción, investigación y determinación. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0666_Goldemberg.pdf

Cita tipo Chicago:
Goldemberg, Sara Hebe. "Acetilmetilcarbinol : producción, investigación y determinación". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1951.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0666_Goldemberg.pdf

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

MINISTERIO DE EDUCACIÓN
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS FÍSICAS
Y NATURALES

ACETILMETILCARBINOL: PRODUCCIÓN, INVESTIGACIÓN Y DETERMINACIÓN

Tesis para optar al título de Doctor en Química presentada por

SARA HEBE GOLDEMBERG

Tesis: 666

- 1951 -

Al Dr. Alfredo Sordelli, por sus

valiosos consejos y críticas,

todo mi agradecimiento.

FCEFN-BA.

I N D I C E

Pág.

Cap. I.- Introducción IV

Cap. II.- Antecedentes bibliográficos. 1

Cap. III.- Material y métodos. 17

Cap. IV.- Resultados experimentales. 29

1. Examen de los métodos cualitativos más importantes de determinación de acetoína y resultados comparativos de los mismos. 30

2. Aplicación de los métodos cualitativos a líquidos fermentados. 35

3. Métodos cuantitativos de determinación de AMC: estudio del método volumétrico de Langlykke y Peterson 41

4. Ensayo de determinación volumétrica empleando menores cantidades de líquido fermentado. 43

5. Ensayo de crecimiento de distintas bacterias en medios con acetilmetilcarbinol como única fuente de carbono. . . . 50

6. Estudio de las condiciones de "desaparición" de acetoína con ciertas cepas de A. aerogenes 57

Cap. V.- Resumen y conclusiones 73

Bibliografía 77

FCEFN-BA.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

El acetilmetilcarbinol o acetoína es un cuerpo que tiene una situación excepcional en el estudio de la sistemática y biología de las bacterias. Puede decirse que está entre los primeros cuerpos que pudieron ser reconocidos por un método sencillo y cuya presencia adquirió muy precozmente un valor taxonómico de primera magnitud. Probablemente junto con el indol ha sido el cuerpo investigado más frecuentemente en la rutina de la investigación bacteriológica. Por ello, son múltiples los métodos para facilitar su formación en los medios de cultivo y reconocerlos.

La irregularidad de la intensidad de las reacciones de la acetoína y la falta de precisión de algunas indicaciones para llevar a efecto su investigación y su determinación cuantitativa,decidieron la elección del tema de tesis que consiste en el estudio comparativo de los métodos para demostrar la presencia del acetilmetilcarbinol y la utilización de los mejores métodos de cultivo para lograr dicho propósito.

Además nos propusimos estudiar la posibilidad de aplicación de un buen método de determinación cuantitativa para poderlo utilizar en forma de micro-método.

Por último, se resolvió investigar los problemas vinculados a la formación y desaparición de la acetoína, fenómenos que están relacionados con la utilización de dicha substancia como fuente de carbono por las bacterias.

En la realización de este trabajo de tesis se ha seguido el plan que se detalla a continuación:

1º. Elección de material y de métodos y enumeración y descripción de los mismos.

2º. Investigación experimental. En el curso de las investigaciones experimentales se realizó el examen de los métodos cualitativos a los efectos de determinar su sensibilidad y aplicabilidad. Se comparó el resultado de la aplicación de dichos métodos a líquidos fermentados, se estudió y adaptó un método cuantitativo para la determinación de pequeñas cantidades de acetoína y por último se investigó la desaparición del acetilmetilcarbinol y la utilización del mismo como fuente de carbono.

CAPÍTULO II

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

El trabajo de O. Voges y B. Proskauer publicado en 1898, describiendo la producción de una coloración parecida a la de la eosina en cultivos de ciertos organismos en glucosa-peptona, a los que se había añadido una solución de potasa al 10 %, y el descubrimiento posterior de que la reacción depende de la producción de acetil-metil-carbinol (AMC), marcan el comienzo de una serie de estudios sobre este cuerpo en su relación con la Microbiología.

Según Harden (1905), el AMC se oxida por el agregado de potasa, y en presencia de peptona se comunica al medio una coloración semejante a la de la eosina. Harden y Norris (1911) informaron que el diacetilo en presencia de una solución concentrada de HOK reacciona con las proteínas dando una coloración rosada con una fluorescencia verde. La coloración parece depender del grupo $H\diagdown N-C\begin{smallmatrix}\diagup NH2\\ \diagdown NH\end{smallmatrix}$, aunque se desconoce la importancia del radical -R. La reacción de Voges-Proskauer (V-P) puede indicarse así.

$C_6H_{12}O_6$ (glucosa) → CH_3-CO-CHOH-CH_3 (AMC) + HOK →
CH_3-CO-CO-CH_3 (diacetilo) + peptona → coloración rosada,

Recordaremos, desde la primitiva reacción de V-P, los diversos ensayos para mejorarla, pues la reacción original es débil y poco clara.

Se trató al principio de facilitar la oxidación de AMC a diacetilo, ya sea haciendo pasar aire a través del medio, como ensayara West en 1908, o bien, según sugirieron Chen y Rettger (1920) por agitación e incubación a 30ºC durante 1-3 horas y agitación nuevamente.

Se trató también de agregar agentes oxidantes. Levine, Weldin y Johnson (1917) después de estudiar varios de dichos agentes (H_2O_2, BaO_2, $Cr_2O_7K_2$), recomendaron el agregado de 2 ó 3 gotas de H_2O_2 a 6 ml. del medio alcalino, calentado en un baño de agua hirviente durante 2 minutos. El uso de H_2O_2 no resultó completamente satisfactorio cuando el medio era coloreado. En 1929 Bedford ensayó el Na_2O_2, agregando 10 mg. a 2,5 ml. del medio de cultivo, seguidos por 1 ml. de HONa 40 %; el tubo de cultivo se ponía en agua hirviente 1 minuto y después se agitaba.

Una dificultad importante experimentada con el uso de agentes oxidantes es la naturaleza transitoria de la coloración de los resultados positivos. Para obviar estos inconve-

nientes sugiere Werkman (1930) el empleo de Cl3Fe como catalizador, con el cual el color permanece durante varios días, y aún después de 1 semana o más, es claramente visible. El Cl3Fe parece catalizar la oxidación del AMC, pues la reacción no se desarrolla en ausencia de un aceptor de hidrógeno. Así la reacción no debe ocurrir en ausencia de oxígeno atmosférico si no se provee otro aceptor de H apropiado. Aparentemente, ésta es la primera vez que se ha buscado una mejora de la reacción de V-P usando un catalizador químico. Los ensayos anteriores han empleado agentes oxidantes que daban por resultado una oxidación rápida y la aparición transitoria de la coloración eosina.

Otro de los catalizadores propuestos es el sulfato de cobre amoniacal (Leifson, 1932).

O'Meara (1931) partió de una base distinta. Hasta el momento se usaba el medio de cultivo de Clark y Lubs para los ensayos de investigación de AMC. Él decidió adoptar un medio sintético incoloro para que no interfiriera con el desarrollo del color. Para eso, partió del medio sintético citratado de Koser, con el agregado de 0,5 % de glucosa. La reacción se observaba en 2-3 minutos, pero se encontró que había una tendencia del AMC a desaparecer de los cultivos hechos en dicho medio al aumentar el tiempo de incubación, que

se debía según el autor, a la reducción a 2-3 butilenglicol. Comprobó además que el agregado de glucosa no aumentaba la intensidad de la reacción y que por el contrario, el agregade de 1 % de glúcosa daba una reacción mucho menos intensa que en un medio con 0,5 %.

O'Meara agregó entonces otro aceptor de hidrógeno al medio, con el objeto de aumentar la formación del AMC e impedir su reducción a 2-3 butanediol. Ensayó con NO3K, fumarato de sodio, aspartato de sodio y azul de metileno, siendo el fumarato el más satisfactorio, pues daba resultados muy constantes y seguros en concentración del 1 %. Según O'Meara, al actuar como aceptor de H, compite con el acetaldehido, con lo que disminuye la cantidad de éste reducido durante la fermentación, quedando más substancia capaz de convertirse en AMC, y en segundo lugar, tiende a acortar la velocidad de reducción del AMC a 2-3 butilenglicol.

Para el ensayo en sí, teniendo en cuenta la ley de acción de masas de que la velocidad de una reacción es proporcional a la concentración de los reactivos, utiliza una solución de potasa mucho más concentrada de lo que se acostumbrara hasta el momento (40 % o mayor), y como catalizador la creatina, o a falta de ésta, diciandiamida, aunque así la reacción se desarrolla más lentamente.

Epstein y Levine (1933) modifican ligeramente la técnica de O'Meara, empleando la creatina en solución al 0,3 % en HOK 40 %, con lo que obtienen el 70 % de las positivas dentro de 1 hora de agregado el reactivo y el 99 % dentro de las 4 horas. Comparan el uso de los métodos de O'Meara, Werkman y el de Leifson, prefiriendo el de O'Meara con los reactivos en solución.

También W. Dorner y E. Hellinger (1935) hacen un estudio comparativo de los métodos utilizados hasta el momento para investigar la presencia de AMC, y aconsejan como consecuencia una combinación de los métodos de Werkman y O'Meara (creatina y Cl3Fe).

En 1936, M. Barritt trata de aumentar la sensibilidad de la reacción utilizando una solución alcohólica de alfa-naftol. Barritt realizó un estudio muy completo sobre la especificidad química de la reacción con alfa-naftol, tratando de reemplazar sucesivamente cada uno de los factores de la reacción: alfa-naftol, peptona y diacetilo.

Tratando de reemplazar el alfa-naftol por cuerpos análogos (con grupos -OH, o anillos naftalénicos), vió que éstos intensificaban poco o nada la reacción; ni siquiera el beta-naftol puede sustituirlo. El poder de intensificar el rojo de la reacción de V-P parece pertenecer pues exclusiva-

mente al alfa-naftol.

El alfa-naftol reacciona con el diacetilo y HOK no sólo en presencia de la peptona, sino también con otros compuestos nitrogenados, como gelatina, caseína, pepsina, caldo, arginina, diciandiamida, creatina, acetato de guanidina, etc. De estas experiencias deduce Barritt que la reacción con alfa-naftol requiere substancias nitrogenadas muy similares a las de la reacción ordinaria de V-P.

Se vió finalmente que reemplazando el diacetilo se obtuvieron resultados positivos con AMC, 2-3 butilenglicol, g-tilenglicol y también con caldo infusión y metanol industrial. Con 2-3 butanediol y etilenglicol las positivas se veían hasta 1:25. No se sabe si estos resultados se deben a una reacción de los glicoles, a la presencia de alguna impureza de los preparados, o si hubo alguna oxidación a diacetilo durante la reacción. Como estas substancias no aparecen en los cultivos en concentraciones tan grandes, este error no afecta el ensayo. Efectivamente, ambas substancias dieron resultados negativos en el V-P ordinario.

El caldo de infusión ordinario dió también positivo con alfa-naftol, probablemente por el extracto de carne presente, pues reaccionaron análogamente los extractos de músculo fresco de buey, caballo y gallina, especialmente

cuando fueron preparados por extracción a baja temperatura seguidos por un tratamiento con vapor. La reacción se debe aparentemente a alguna substancia análoga al diacetilo o AMC extraída del músculo. Resulta obvio entonces que el caldo infusión no puede servir como medio de cultivo para ensayar la formación de AMC.

Una solución al 5 % de alfa-naftol en metanol industrialda color rosa con peptona y HOK, probablemente por los productos nafténicos de la madera presentes en el alcohol, que posiblemente contiene trazas de substancias de naturaleza cetónica relacionadas o idénticas al diacetilo. Es por lo tanto esencial usar alcohol etílico absoluto como disolvente del alfa-naftol en este ensayo, concluye Barritt.

Los trabajos posteriores no introducen ya cambios radicales en la técnica, pues se limitan sólo a modificaciones o combinaciones de los métodos fundamentales de O'Meara y de Barritt.

Así, Batty-Smith (1941) modifica la técnica de Barritt agregando una pizca de creatina, según lo ya aconsejado por éste, y emplea además el Cl3Fe que intensifica algo el color, y la agitación durante 5 minutos para aumentar la velocidad de desarrollo e intensidad del color; Coblentz (1943) aconseja la combinación de alfa-naftol con la solución de HOK-creatina.

De fundamento completamente distinto es el ensayo que proponen Pirot, Bourgain y Dufau-Casanabe (1943). Se basan en que el AMC tiene una función alcohólica secundaria vecina a una función cetona y aconsejan usar para la investigación cualitativa de laacetoína, la formación de la fenil-osazona, de forma cristalina perfectamente definida y reconocible, que Grimbert ya había señalado en 1901.

Las primeras determinaciones cuantitativas de AMC fueron gravimétricas, por transformación en níquel-dimetilglioxima.

Lemoigne (1920) describió una reacción específica para el dosaje de AMC que consiste en agregar solución de Cl3Fe a una porción del cultivo para oxidar la acetoína a diacetilo, y destilar, El destilado se agrega a una mezcla de HONH4, ClH.H2NHOH y Cl2Ni. El diacetilo se convierte en dimetilglioxima y ésta reacciona con la sal de níquel dando un precipitado rojo, la níquel-dimetilglioxima, que se estima por pesada.

Van Niel (1927) modificó la reacción, que si bien muy sensible, no daba resultados cuantitativos ni constantes. Agrega un exceso de Cl3Fe a una parte alícuota del cultivo, destila lentamente y recoge el destilado en una mezcla de ClH.H2NHOH, acetato de sodio y Cl2Ni. Los resultados son constantes, pero sólo se puede determinar así el 84 % del

AMC aproximadamente.

La modificación de van Niel fué también adoptada por Tomiyasu(1937) quien hace el ensayo sobre menores cantidades de líquido fermentado, e igualmente Roland Kunze (1936) propone una microdeterminación gravimétrica sobre 2-20 ml. del líquido a analizar. Kniphorst y Kruisheer (1937) aumentan el rendimiento de la reacción de Lemoigne-v.Niel llevando a cabo la oxidación con una mezcla de SO4Fe y Cl3Fe.

La formación de níquel-dimetilglioxima se utilizó también para determinaciones colorimétricas (Prill y Hammer, 1938; Hooreman, 1946), y para investigaciones cualitativas, habiéndose propuesto en este caso el empleo de sales ferrosas en vez de níquel (Pirot, Bourgain, Dufau-Casanabe,1943).

Más cómodo que el método gravimétrico resulta el volumétrico propuesto por Langlykke y Peterson (1943), basándose en que el AMC tiene el grupo acetilo unido directamente al C, por lo cual puede dar la reacción halofórmica. Para aplicar la reacción del iodoformo es necesario eliminar todos los demás compuestos que puedan reaccionar con el iodo. La acetona está generalmente en gran exceso en algunas fermentaciones, pero es prácticamente eliminada por completo por la destilación de la mitad del volumen de una solución acuosa. El etanol en concentración apreciable también reacciona con

el iodo, pero esta reacción es muy incompleta a temperatura ambiente y en el corto tiempo de reacción usado. Sin embargo, es también eliminado completamente por la destilación de la mitad del volumen. El 2-3 butilenglicol reacciona con el iodo alcalino en 15 minutos a la temperatura ambiente y da un contenido aparente de AMC equivalente a 10 % de su propio peso. Sin embargo, la no volatilidad de este compuesto hace que el error resultante del tercer cuarto del destilado sea despreciable.

Olson y Johnson (1948), variando la concentración de los reactivos, han modificado el método para 0,2-1,0 mg. de acetoína por muestra.

A. Qureshi, Mansa Ram y J. N. Ray (1944) estudiaron además la posibilidad de reacción entre el AMC y el licor de Fehling para estimar acetoína en presencia de otros compuestos neutros.

En este trabajo hemos tenido especialmente en cuenta la producción de AMC por el A. aerogenes, pues es una reacción diferencial de E. coli, sumamente utilizada en el análisis corriente de aguas.

Así hemos visto una interesante propiedad que poseen algunas cepas de Aerobacter aerogenes, de "destruir" el AMC, es decir, que a medida que aumenta el tiempo de incubación las reacciones positivas de acetoína pasan a ser negativas;

este hecho fué observado ya por Linton (1924), quien informó la desaparición de una V-P positiva en 60 horas. En 1927, Frederick S. Paine encontró que al usar un caldo de glucosa-peptona (1 % de cada uno), algunas cepas de A. aerogenes que daban una reacción positiva franca de AMC en 36-48 horas, tenían una reacción dudosa a los 4 días, y negativa a los 7 días. Se presentaban entonces dos alternativas: a) la acetoína es destruída por el microorganismo, ó b) se termina el aprovisionamiento de peptona parcialmente necesario para el desarrollo del color. Para demostrar que b) no es la responsable, en tubos de distintas edades se agregó solución recién preparada de peptona al 10 %, la cual no produjo diferencias apreciables. De ahí que Paine opinara que "parece muy probable que la mayoría de las reacciones de desaparición del AMC se deben a su destrucción" y probablemente no al consumo de la peptona.

En 1928 O. B. Williams y Marie B. Morrow ensayaron la propiedad de "destruir" el AMC en 113 cepas, comprendiendo todas las coliformes, las fluorescentes verdes, y representantes de los géneros Salmonella, Eberthella, Proteus, Serratia y Bacillus, observándose la desaparición del color de una reacción positiva en las bacterias coliformes, especialmente A. aerogenes (no todas las cepas), algunas bacterias

verdes fluorescentes, y todos los aerobios esporulados ensayados (B. subtilis, B. cereus, B. mycoides, B. vulgatus, 1 cepa de cada uno; 3 esporulados no identificados).

Para determinar si la velocidad de destrucción del AMC era influenciada por el agregado de material nutritivo extra, se reforzó el medio con glucosa de 0,1 a 1 %; con glucosa y peptona 0,5 % de cada una, y con peptona sola 0,5 %. La peptona sola no produce efecto, pero en cambio el agregado de glucosa en cantidades mayores al 0,1 %, produjo, salvo en un cultivo, una destrucción retardada, siendo este retardo aproximadamente proporcional a la cantidad de glucosa agregada. De ahí que los autores supongan que la desaparición del AMC se debe a que es utilizado como fuente de C. Ya estos autores observan además que la capacidad de "destruir" AMC no se corresponde con ninguna otra característica que se haya determinado.

Ralph P. Tittsler (1938), repasando los trabajos anteriores, hace la salvedad que la desaparición de AMC no está claro si se debe a que las bacterias lo fermenten o lo reduzcan a 2-3 butanediol.

Los ensayos de fermentación se hicieron en un caldo extracto de carne con 1 % de AMC, y la habilidad de las bacterias de utilizar acetoína presente en el medio como única fuente de C se determinó en un medio sintético del tipo del

de Koser, reemplazando el citrato por AMC. Se observó que aproximadamente la mitad de las cepas de A. aerogenes y A. oxytocum fermentaban esa substancia, pero no era atacado por ninguna de las cepas de A. cloacae, A. levans o por ninguno de losmiembros del grupo Escherichia o el grupo intermediario. No hubo nunca producción de gas. Todas las cepas del género Aerobacter, salvo dos, que fermentaban el AMC en caldo nutritivo, también crecían y producían ácido en el medio sintético, y daban V-P negativa en el medio de Clark-Lubs después de 3-5 días.

Tampoco Tittsler encontró ninguna relación entre la capacidad de fermentar AMC y alguna otra característica de cultivo.

El autor aconseja, por lo tanto, ensayar la producción de AMC en cultivos de menos de 3 días. Sugiere además como explicación de la distinta actividad de diferentes cepas, que estén relacionadas con diferencias en los potenciales de óxido-reducción.

También en 1938, como parte de una serie de estudios sobre el AMC, Yukio Tomiyasu (') observa la ausencia de producción de acetoína por E. coli, y la desaparición de AMC en al-

(') Desgraciadamente, por encontrarse los trabajos en japonés, sólo hemos podido consultar los resúmenes de los mismos.

gunos cultivos de A. aerogenes. Además, no hay producción de AMC cuando la solución de azúcar es demasiado diluída, indicando 0,5 % como concentración óptima. Observó también el crecimiento en un medio artificial inorgánico con AMC como única fuente de C. Tomiyasu afirma que el ácido acético es un producto de descomposición del AMC. Basándose en sus observaciones, establece una clasificación del grupo coli-aerogenes desde el punto de vista de la producción y descomposición del AMC: los coli no producen ni asimilan AMC, el grupo aerogenes produce AMC, pero sólo algunos de ellos lo asimilan. Sostiene que la desaparición de la reacción de V-P no debe ser atribuída a la transformación en 2-3 butilenglicol.

Existen también algunos trabajos sobre fermentación de acetoína por otras bacterias: Virtanen y Kontio (1939) observan que cultivos aislados de manteca son capaces de "destruir" el AMC o diacetilo agregado a la leche. Segal (1940) aprovecha la capacidad del Staphylococcus albus de utilizar el AMC como única fuente de C para diferenciarlo del Staphylococcus aureus.

Más recientemente, M. Lemoigne y M. Hooreman (1948), estudiando el problema de la utilización del AMC, coinciden en que la importancia de la cepa es innegable, y de que las condiciones de nutrición del organismo son por lo menos igual-

mente importantes. Puesto que la no toxicidad del AMC y del butanediol hacen innocua su acumulación, cuando las condiciones para el crecimiento microbiológico son desfavorables o cuando falta el azúcar, el butilenglicol y la acetoína pueden actuar como substitutos de fuente de C y energía. Así estos productos desempeñan en ciertos casos, el papel de substancias de reserva extracelulares.

Todos los autores coinciden en la necesidad de la aereación para la mejor producción de AMC: es así que todas las patentes de producción de AMC por fermentación utilizan una aereación intensa (Verhave 1928, 1929, 1933; Kluyver y Scheffer 1933) para impedir la formación de butilenglicol o para transformar éste en AMC. Ambos cuerpos forman un sistema de óxido-reducción; todo factor que levante el potencial de óxido-reducción favorece la acumulación de AMC, mientras que un bajo potencial lleva el sistema a la formación del glicol (Stahly y Werkman, 1942). Así comprobaron recientemente Paretsky y Werkman (1947) que el agregado de azul de metileno a las fermentaciones de glucosa por A. aerogenes aumenta los rendimientos de AMC a expensas del 2-3 butilenglicol. El azul de metileno lleva el sistema a un potencial redox en que puede funcionar como aceptor de hidrógeno para realizar la oxidación del glicol al carbinol. El oxígeno o el

aire a presión también aumentan la conversión del 2-3 butilenglicol a AMC puesto que funcionan como aceptor de hidrógeno, resultando la combinación de azul de metileno y presión más efectiva que cada uno de ellos por separado.

Pirot, Bourgain y Dufau-Casanabe (1943) han estudiado la importancia de los factores de óxido-reducción en la producción de acetoína, especialmente el ácido fumárico, empleado en el medio de O'Meara y han comprobado que dicho ácido permite apreciar después de 24 horas de incubación la producción de AMC a expensas de la glucosa por un germen tipo Aerobacter. En ausencia de factores de óxido-reducción hay formación lenta y progresiva de acetoína. Los factores de óxido-reducción hidroquinona y ácido ascórbico no pueden reemplazar al fumárico; la adrenalina tiene una acción favorecedora positiva, pero débil, en la producción de AMC.

CAPÍTULO III

MATERIAL Y MÉTODOS

La acetoína usada en estas experiencias fué traída de los Estados Unidos, proveniente de la Fairmount Chemical Co. Era un líquido que conservado unas semanas en la heladera, separó un sólido soluble en agua y alcohol e insoluble en éter. Se lo purificó según lo aconsejado por Stahly y Werkman (1936) lavándolo con éter y se lo secó en corriente de carbónico Se obtuvo así un sólido blanco y cristalino, sin punto de fusión definido (el dímero), que se utilizó en todas las experiencias.

A continuación se detallan los reactivos empleados en los métodos cualitativos de determinación de acetoína, y se indica la técnica empleada por los autores para investigar el AMC.

Voges-Proskauer:

Se agrega al cultivo un volumen igual de solución de HCK al 10 %. Al cabo de 24 horas se observa una coloración parecida a la de la eosina.

Werkman:

Emplea Cl3Fe al 2 % y solución de HONa al 10 %.

A 5 ml. del medio se agregan 2 gotas de Cl3Fe y luego 5 ml. de HONa. El Cl3Fe debe agregarse antes para impedir una floculación abundante. El resultado positivo está caracterizado por una coloración cobriza que comienza en la superficie y se extiende por el medio después de unos minutos. Según observaran Ruchhoft, Kallas, Chinn y Coulter (1931) conviene llevar los tubos después de la reacción, a 37º, lo que acelera la formación de color.

O'Meara:

Usa una pizca de creatina sólida (unos 25 mg.) seguidos por 5 ml. de HONa concentrado, nunca menor de 40 %.

Nosotros hemos usado la modificación de Levine, Epstein, Vaughn.

Levine, Epstein, Vaughn:

Emplean una solución de 0,3 % de creatina en HOK 40 %. Esta solución puede conservarse durante 4-6 semanas si se guarda en la heladera y no más de 2 semanas a la temperatura ambiente (22-25ºC), mientras que a mayor temperatura se deteriora muy rápidamente.

Leifson:

El reactivo se prepara así:

1 g. de $SO_4Cu.5H_2O$ se disuelve en 40 ml. de $HONH_4$ conc. dens. 0,90. Esta solución se agrega a 960 ml. de HONa por lo menos al 10 % (una concentración inferior al 10 % puede precipitar el Cu). La solución azul resultante es estable si se conserva en botella tapada.

Se mezclan cantidades iguales de reactivo y cultivo. A la temperatura ambiente, sin agitar, se forma en la superficie una coloración rojo-brillante en 10-20 minutos. Inmediatamente después de mezclar el reactivo se desarrolla una coloración levemente purpúrea en el tubo, que desaparece en pocos minutos, y no debe confundirse con el positivo que se forma en la superficie.

Dorner, Hellinger:

El método recomendado es tomar 1 ml. del cultivo en un tubo de ensayo ancho, agregar una gota de creatina 1 %, agitar, una gota de Cl_3Fe 2 %, agitar bien; 1 ml. de HONa 20 % y agitar. Colocar a unos 37º pero no agitar al principio para observar antes y con mayor claridad el resultado positivo indicado por una coloración rosa eosina a rojo brillante formado en la superficie y que se difunde hacia abajo al medio.

Barritt:

Usa 1 ml. del cultivo al que se agregan 0,6 ml. de alfa-naftol al 5 % en solución alcohólica, y 0,2 ml. de HOK al 40 %. Resultados también buenos se obtienen con 0,5 ml. de alfa-naftol al 6 % y 0,5 ml. de HOK al 16 %. Es necesario no agregar un exceso de HOK porque tiende a enmascarar las reacciones más débiles al dar una coloración cobriza con el alfa-naftol solo.

Con esta técnica se obtienen resultados positivos 2-5 minutos después de agregado el reactivo.

Batty-Smith:

A 5 ml. del cultivo se agrega una pizca de creatina y 2 gotas de Cl3Fe 2 %, y se agita un poco la mezcla. Se agregan 3 ml. de una solución 5 % de alfa-naftol en alcohol absoluto, seguidos de 1 ml. de HOK 40 %. Se agita la mezcla vigorosamente 5 minutos en un agitador de Kahn.

Nosotros hemos empleado la solución de creatina de Levine, Epstein, Vaughn, y a falta de agitador mecánico, hemos agitado la gradilla 5 minutos a mano.

Coblentz:

A 2 ml. de medio se agregan 0,6 ml. de alfa-naftol (5 g. en 100 ml. de alcohol 95 %), seguidos por 0,2 ml. de HOK 40 %

al que se había agregado 0,3 % de creatina. Se agitaron los tubos vigorosamente durante 30-60 segundos. Una reacción positiva se caracteriza por una intensa coloración rosada que se desarrolla desde unos pocos segundos a 5-10 minutos después de agregados los reactivos.

Osazona:

Se lleva a baño maría durante 20-30 minutos una mezcla de volúmenes iguales del cultivo microbiano y del reactivo fenil-hidrazina (1 ml, o aún menos de cada uno bastan para la reacción). El examen microscópico directo entre porta y cubre, muestra cristales muy característicos, de longitud bastante variable, entre 50 y 120 μ; al cabo de 2 minutos al baño maría ya se nota la presencia de pequeños cristales muy regulares, en forma de cruz de S. Andrés o de X; si se mantiene el contacto al baño maría durante una media hora, la forma cristalina inicial se desarrolla y semeja dos hojas de helecho cruzadas, pudiendo modificarse la disposición inicial y completar el número 8.

Para la determinación cuantitativa se empleó la técnica de Langlykke y Peterson:

Se utilizó un aparato de destilación construído por el Sr. G. Klobassa, consistente en un balón de 500 ml. de

cuello esmerilado que se adapta a un refrigerante corto.

La técnica es la siguiente:

Se ponen en el balón 100 ml. del líquido en el que se quiere determinar AMC. La velocidad de calentamiento se ajusta de tal modo que el destilado que se recoge esté frío y el medio que destila hierva regularmente. Se recoge una fracción de exactamente 50 ml. en una probeta, que puede desecharse o usarse en la determinación de los productos más volátiles de la fermentación. Se recoge luego una segunda fracción de exactamente 25 ml. y se analiza por la reacción del iodoformo.

Los 25 ml. destilados se agregan a 15 ml. de HONa N/1 en un Erlenmeyer de 150 ml. Se enjuaga la probeta con 3 porciones de unos pocos ml. de agua y se agregan al Erlenmeyer. Después, mientras se agita constantemente el Erlenmeyer con una mano, se agregan rápidamente exactamente 5 ml. de iodo 0,2 N con una pipeta sostenida en la otra mano. La precipitación del iodoformo comienza casi inmediatamente y después de 10 minutos la reacción es completa. Después de permanecer 10-15 minutos fuera de la luz solar, se echan 20 ml. de SO_4H_2 N/1 y el iodo liberado se titula inmediatamente con $S_2O_3Na_2$ 0,1 N, usando almidón como indicador. Se usa una semimicrobureta que permite apreciar 0,01 ml. Se hace un blan-

co con 5 ml. de la solución de iodo, con agua destilada reemplazando a la muestra.

$$CH_3\text{-}CO\text{-}CHOH\text{-}CH_3 + 3\ I_2 + 4\ HONa \rightarrow CHI_3 + 3\ INa + NaOOC\text{-}CHOH\text{-}CH_3 + 3\ H_2O.$$

Como 1 molécula de AMC equivale a 6 átomos de iodo, 1 milimol (ó 88 mg.) equivalen a 60 ml. de iodo 0,1 N. Por lo tanto, por cada ml. de iodo 0,1 N usado en la reacción del iodoformo hay 1,467 mg. de acetoína en la muestra. Como se ha comprobado que en el tercer cuarto del destilado pasa el 23,9 % de la muestra, para obtener el contenido total de AMC de los 100 ml. destilados, se divide el contenido del tercer cuarto del destilado por el factor 0,239.

$$\text{mg. de AMC en 100 ml.} = \frac{1{,}467 \times \Delta\ \text{ml. } S_2O_3Na_2}{0{,}239}$$

Para la determinación empleando una cantidad menor de líquido fermentado, se empleó otro aparato de destilación, también construído por el Sr. Klobassa. Consta de un tubo de vidrio Pyrex de 4 cm. de diámetro y 20 cm. de largo, con borde esmerilado, que se adapta a un refrigerante. Hemos utilizado un tubo de ese largo porque el líquido fermentado por A. aerogenes produce siempre mucha espuma al destilar y se disminuye así el peligro de que pase ésta al destilado.

Se introducen en el tubo de destilación 20 ml. de líquido a analizar, y se calienta directamente con cuidado. Los primeros 10 ml. se recogen en probeta de 10 ml., y los 5 ml. siguientes (la fracción a titular) en un matracito de 5 ml., también hecho por el Sr. Klobassa, y aforado por pesada con agua destilada.

El tercer cuarto del destilado se agrega a 5 ml. de HONa N/1 en un Erlenmeyer de tapa esmerilada, se enjuaga el matracito con tres porciones de agua, y se juntan éstas al destilado. Después se agregan 5 ml. de iodo 0,05 N rápidamente y se deja en la oscuridad 10-15 minutos, se echan 5,5 ml. de SO_4H_2 N y se titula inmediatamente con $S_2O_3Na_2$ 0,025 N. Se hace también un blanco con agua destilada.

Veremos el cálculo del contenido de AMC al estudiar este método.

Como medios de cultivo, se emplearon el que indican Clark y Lubs para la reacción de V-P y que es el mismo adoptado por Difco:

Peptona. . . . . 5 g.

Glucosa. . . . . 5 g.

PO_4HK_2 . . . . . 5 g.

Agua destilada . . . .1000 ml.

Se ajusta a pH 7,2 y se esteriliza 20 minutos a 120°.

El medio de O'Meara es el siguiente:

ClNa	5 g.
SO4Mg.	0,2 g.
PO4H2NH4	1 g.
Citrato de sodio (cristalino).	2,77 g.
Glucosa	5 g.
Ácido fumárico	7 g.
Agua destilada hasta	1000 ml.

Ésta es la fórmula que indican Pirot, Bourgain y Dufau Casanabe, quienes han reemplazado los 10 g. de fumarato de sodio que indica O'Meara, por 7 g. de ácido fumárico. El medio con fumarato de sodio no requiere ajuste de la reacción; el de fumárico, por el contrario, debe llevarse a pH 7,5. Nosotros hemos usado el ácido fumárico por ser la droga de que disponíamos.

Hemos agregado la glucosa asépticamente al medio, pues esterilizándola con los demás ingredientes el medio tomaba un color amarillento. También hemos esterilizado el medio completo, filtrándolo por Seitz.

La producción de AMC se ensayó también en un medio sintético con glucosa como única fuente de carbono:

$PO_4HNaNH_4.4H_2O$	1,5 g.
PO_4H_2K	1,0 g.
SO_4Mg	0,2 g.
Glucosa	5,0 g.
Agua destilada	1000 ml.

Se lleva a pH 6,8-7,0 y se esteriliza a 120º durante 20 minutos. La glucosa se agregó asépticamente al medio.

Para los ensayos de utilización de AMC se empleó el medio recomendado por Tittsler:

$PO_4HNaNH_4.4H_2O$	1,5 g.
PO_4H_2K	1,0 g.
SO_4Mg	0,2 g.
Acetoína	2,0 g.
Agua destilada	1000 ml.

Se lleva a pH 6,8-7,0 y se esteriliza 20 minutos a 120º.

La cantidad de AMC se varió de modo de contener 0,1 %; 0,05 % y 0,02 %. También se preparó un medio que contenía 0,5 % de glucosa y 0,02 % de AMC.

Además los ensayos de fermentación se efectuaron sobre caldo extracto de carne común, con el agregado de AMC en concentraciones de 0,2 %, 0,1 %, 0,05 % y 0,02 %; con 0,5 % de glucosa; con 0,5 % de glucosa y 0,02 % de AMC.

Se utilizó también el medio de O'Meara sin glucosa; sin glucosa y con AMC al 0,2 % y 0,02 %; el mismo medio sin fumárico y sin glucosa, pero con AMC al 0,2 % y 0,02 %.

Las cepas empleadas provienen en parte de las utilizadas como material de enseñanza, algunas del Instituto Nacional de la Nutrición, otras de Obras Sanitarias de la Nación y algunas fueron aisladas por nosotros. Las cepas de B. polymyxa y las de B. macerans fueron cedidas por la Srta. Nélida Giambiagi de las utilizadas para su tesis, proviniendo en parte del N.R.R.L.

La lista es la siguiente:

Aerobacter aerogenes, 6 cepas (2 "destructoras").

Escherichia coli I, Intermediario I y II, Irregular I y VII.

Bacillus polymyxa, 10 cepas.

Bacillus macerans, 5 cepas.

Los cultivos se mantuvieron en agar extracto de carne, salvo en el caso de B. polymyxa, en que también se empleó el agar rojo neutro. Se utilizaron las temperaturas óptimas de incubación, 30º (28º en nuestro caso) y 37º.

C A P Í T U L O I V

RESULTADOS EXPERIMENTALES

Se trazó el siguiente plan de trabajo:

1) Examen de los métodos cualitativos más importantes de determinación de acetoína y resultados comparativos de los mismos.

2) Aplicación de los métodos cualitativos a líquidos fermentados.

3) Métodos cuantitativos de determinación de AMC: estudio del método volumétrico de Langlykke y Peterson.

4) Ensayo de determinación volumétrica empleando menores cantidades de líquido fermentado.

5) Ensayo de crecimiento de distintas bacterias en medios con AMC como única fuente de carbono.

6) Estudio de las condiciones de "desaparición" de AMC con ciertas cepas de A. aerogenes.

A continuación se detalla el trabajo experimental y los resultados obtenidos correspondientes a cada uno de los tópicos enumerados.

1) Examen de los métodos cualitativos más importantes de determinación de acetoína y resultados comparativos de los mismos.

Se estudiaron y compararon los métodos cualitativos enumerados en el capítulo anterior, siguiendo las técnicas allí indicadas, con el objeto de determinar su sensibilidad y comparar sus ventajas e inconvenientes.

Para determinar el límite de sensibilidad de cada uno se hicieron diluciones crecientes de AMC en dos medios distintos de cultivo, que son los que se utilizaron para los ensayos de fermentación: el de Clark-Lubs, y el medio sintético con glucosa como única fuente de carbono.

Para tener valores comparativos de límite de sensibilidad se redujeron las cantidades de todos los reactivos para 1 ml. de cultivo.

Como la técnica original de V-P dió resultados deficientes y exigió un tiempo demasiado largo para la lectura (24 horas), no se la utilizó en la comparación.

Werkman:

Según el autor, el Cl3Fe no lleva a cabo la oxidación 2-3 butanediol en las condiciones del ensayo, y cualquier organismo que haya reducido el AMC a 2-3 butilenglicol no dará una falsa positiva.

Revela una concentración de AMC de 1:10.000-1:20.000.

La reacción es muy poco neta, y lenta en aparecer, acelerándose un poco si se desarrolla el color a 37º, según lo ya aconsejado por el autor.

Leifson:

Presenta una serie de inconvenientes: la coloración purpúrea que se desarrolla en el primer momento impide distinguir con nitidez una reacción dudosa de una negativa. Por otra parte, sólo es positiva en 1: 2.000 y 1:5.000 en medio ya peptonado. En medios sintéticos no es aplicable, pues falta el grupo guanidina que se combine con el diacetilo para dar el compuesto rosado. Hemos resuelto la dificultad agregando al medio sintético, en éste y en los demás casos análogos, una pizca de peptona (en polvo para no diluir), en el momento de realizar la reacción.

O'Meara:

Esta técnica no fué utilizada, usándose en cambio la modificación de Levine-Epstein-Vaughn, Según su autor, puede revelarse fácilmente 1:20.000 y aún 1:50.000 de AMC. Probablemente la intensificación de la reacción con creatina se debe a que provee mayor cantidad de grupo guanidina.

Levine-Epstein-Vaughn:

El uso de la solución creatina-HOK permite la realización de la reacción con un solo reactivo.

El desarrollo de la reacción es bastante rápido y al cabo de media hora se tiene el 52 % de los resultados positivos, y en 24 horas el 96,5 %, según lo indican Vaughn, Mitchell y Levine.

Puede aplicarse directamente en cualquier tipo de medio, aún sintético.

Permite apreciar el AMC en una concentración de hasta 1:100.000.

Dorner-Hellinger:

Permite apreciar el AMC en una concentración de hasta 1:100.000, al cabo de media hora.

Mejora la sensibilidad de la reacción de O'Meara, pero el desarrollo de la reacción no es tan rápido como en técnicas posteriores.

Barritt:

Esta reacción es la de uso general en los laboratorios.

Según su autor, revela una concentración de AMC de 1:500.000-1:1.000.000, y hasta de 1:2.500.000 con creatina.

Nosotros hemos encontrado esa sensibilidad al cabo de media hora.

Es un método muy satisfactorio por su sencillez, su alta sensibilidad y la nitidez de lectura. Además la coloración se desarrolla rápidamente, especialmente si se agita. Vaughn, Mitchell y Levine han encontrado que en media hora se tiene el 94,5 % de las reacciones positivas, el 99,5 % a la hora, y el 100 % a las 2 horas.

Al usarla en medios sintéticos, hemos debido agregar una pizca de peptona en el momento de efectuar la reacción.

Batty-Smith:

El tono es más intenso que en la reacción de Barritt, y las reacciones más netas; las dudosas son casi inexistentes. Puede revelarse 1:2.000.000 de AMC, pero el uso de este método resulta fastidioso, pues exige la agitación en agitador de Kahn (nosotros hemos agitado a mano) durante 5 minutos.

Coblentz:

Se puede revelar 1:2.000.000 de AMC.

La reacción es sumamente sencilla de realizar, rápida en desarrollar, más si se la agita, y neta. A igual sensibilidad que la modificación de Batty-Smith, es mucho más sencilla de ejecutar, por lo que se la ha elegido en todas las

ocasiones subsiguientes en que fué necesario investigar la presencia de AMC. Además es aplicable en cualquier medio de cultivo, aún sintético.

Osazona:

La técnica es relativamente sencilla, pues puede ejecutarse en el medio tal cual, pero no resulta neta. Además requiere el uso del microscopio.

Su sensibilidad es de 1:1.500.

2) Aplicación de los métodos cualitativos a líquidos fermentados.

Todas las reacciones cualitativas se aplicaron a seguir el curso de una fermentación. Se usó como ejemplo la del A. aerogenes, empleando distintas cepas y en distintas condiciones. Se eligieron especialmente cepas "destructoras" por ser en este caso más interesante el conocimiento del momento de la desaparición de una reacción positiva de acetoína.

Diariamente se sacó muestra estérilmente, y se ensayó la reacción de AMC por los distintos métodos, en diluciones crecientes de la muestra con el medio utilizado en el ensayo, considerándose como límite la mayor dilución en que la reacción resulta positiva.

Deseábamos ver así en qué forma acusan las distintas técnicas las variaciones del contenido en AMC. Para ello se realizaron los ensayos en medios muy diferentes: el de Clark-Lubs, que es el recomendado en casi todas las reacciones; un medio sintético en que la única fuente de carbono es la glucosa, y también el medio de O'Meara. Se ensayaron además dos temperaturas de incubación: 37º y 28º (30º es lo que indica la literatura). Esta última es la temperatura óptima de crecimiento del A. aerogenes, y la recomendada actualmente para la producción de AMC. Se probaron dos cepas "des-

tructoras" de A. aerogenes: la 14 y la 15.

Las cifras que figuran en los cuadros corresponden al denominador de la dilución de 1 parte de la muestra en el medio ensayado, en la que aún se observa una reacción positiva.

I) Cepa 15 de A. aerogenes, incubada a 37º en el medio de Clark-Lubs. Esta temperatura y este medio son los que se recomendaban hasta hace unos años para la reacción (Standard Methods of the American Public Health Association, 1933, 1936; Barritt, 1936, etc.).

Cuadro I.

Método	Tiempo de incubación (días)				
	1	2	3	4	6
Werkman	-	10	±	-	
Leifson	-	±	-		
Levine-Epstein-Vaughn	10	10	±	±	-
Dorner-Hellinger	25	25	10	10	-
Barritt	150		75	15	-
Batty-Smith	50	150	50	15	-
Coblentz	200		100	35	-

II) Cepa 15 de A. aerogenes, incubada a 28º en medio de Clark-Lubs. Hemos adoptado en este ensayo la temperatura recomendada por los trabajos más recientes (Vaughn, Mitchell

y Levine, 1939. Coblentz, 1943; Taylor, 1945), conservando el medio de Clark-Lubs para comparar resultados.

Cuadro II.					
Método	Tiempo de incubación (días)				
	2	3	4	6	7
Werkman	±	±	-		
Leifson	±	-			
Levine-Epstein-Vaughn	20	15	5	-	
Dorner-Hellinger	20	10	5	-	
Barritt	250	100	25	-	
Batty-Smith	300	150	75	±	-
Coblentz	500	250	100	20	±

III) La misma cepa 15, sembrada en medio sintético con glucosa como única fuente de carbono, e incubada a 37º.

Cuadro III.					
Método	Tiempo de incubación (días)				
	1	3	7	9	10
Werkman	-	±	-		
Leifson	-	-			
Levine-Epstein-Vaughn	±	10	10	-	
Dorner-Hellinger	±	10	10	-	
Barritt	10	30	50	-	
Batty-Smith	35	75	100	±	-
Coblentz	50	100	150	±	-

IV) Cepa 14 de A. aerogenes, sembrada en el medio sintético con glucosa, e incubada a 28º.

Cuadro IV.					
Método	Tiempo de incubación (días)				
	3	7	8	15	16
Werkman	5	-			
Leifson	-	-			
Levine-Epstein-Vaughn	15	10	5	-	
Dorner-Hellinger	20	10	±	-	
Barritt	100	35	20	5	-
Batty-Smith	250	75	50	±	-
Coblentz	300	100	100	20	±

V) La misma cepa 14, sembrada en el medio de O'Meara e incubada también a 28º.

Cuadro V.					
Método	Tiempo de incubación (días)				
	1	3	5	6	7
Werkman	±	±	-		
Leifson	-	±	-		
Levine-Epstein-Vaughn	15	50	20	15	10
Dorner-Hellinger	15	50	20	20	15
Barritt	200	350	75	50	35
Batty-Smith	350	500	250	100	75
Coblentz	500	750	350	150	100

De la observación de estos cuadros se llega a la conclusión de que en todas las condiciones ensayadas (cambiando medio de cultivo, temperatura de incubación y cepa), la técnica de Coblentz une a sus ventajas ya enumeradas, la de constituir el mejor índice de variación del contenido de AMC en el curso de una fermentación. La técnica de Batty-Smith, que había dado en el ensayo de sensibilidad un límite igual a la de Coblentz, resulta en la práctica un poco inferior a ésta, pero superior a la de Barritt con alfa-naftol solamente.

Se comprueba también que las técnicas de Dorner-Hellin-

ger y Levine-Epstein-Vaughn son prácticamente del mismo valor para señalar la presencia de acetoína, pero por su menor sensibilidad no revelan las variaciones del contenido de AMC. Finalmente, las reacciones de Werkman y de Leifson no resultan aconsejables, pues por su limitada sensibilidad sólo tienen un valor relativo.

3) Métodos cuantitativos de determinación de AMC: estudio del método volumétrico de Langlykke y Peterson.

Debido al material de que disponíamos, y por ser más rápido y accesible que los gravimétricos, se eligió entre los métodos cuantitativos el volumétrico, de Langlykke y Peterson.

Este método se realizó originalmente según las indicaciones de sus autores.

Se ensayó primero la destilación empleando cantidades conocidas de AMC, en la misma proporción aproximadamente que la producida comúnmente por A. aerogenes (unos 50 mg. %). Se prepararon las soluciones de acetoína en los medios empleados para los ensayos de fermentación, observándose que en el medio no fermentado la destilación no ofrecía ninguna dificultad. No ocurrió lo mismo con los líquidos fermentados por A. aerogenes, que producían una abundante espuma al destilar, obligándonos a un calentamiento muy cuidadoso. El líquido fermentado por B. polymyxa hierve regularmente, sin espuma.

Los resultados obtenidos con las soluciones de AMC en los medios no fermentados se consignan en el cuadro VI.

Se observa en este cuadro que el error encontrado oscila entre 2 y 5 %. Si recordamos que con la modificación

Cuadro VI.		
AMC agregado mg.%	AMC hallado mg.%	Error %
54,9	52,8	- 3,8
50,8	47,4	- 6,6
43,4	44,2	+ 1,8
50,0	47,1	- 5,8
50,4	49,2	- 2,3

de Kniphorst y Kruisheer el rendimiento de la determinación gravimétrica ha podido ser llevado a 96-7 %, resulta de todo punto de vista el método volumétrico preferible, pues en forma más rápida y sencilla, se consiguen aproximadamente los mismos resultados.

Como deseábamos seguir cuantitativamente el curso de una fermentación, nos encontramos con el inconveniente de necesitar un volumen muy grande de medio a fermentar, pues para cada determinación se emplean 100 ml. de líquido claro. Por esta razón tratamos de modificar la técnica para usar una cantidad menor de líquido fermentado.

4) Ensayo de determinación volumétrica empleando menores cantidades de líquido fermentado.

Como la destilación en el método de Langlykke y Peterson requiere una cantidad relativamente grande de líquido fermentado, se trató de hallar un método en que se emplearan menores cantidades de material a analizar.

Se ensayó así de utilizar 20 ml. de líquido fermentado, efectuándose la destilación en un aparato de vidrio de dimensiones adaptadas, y recogiendo sólo 5 ml. para la titulación (el tercer cuarto).

Para variar la concentración de los reactivos en concordancia con la cantidad menor de AMC existente en los 5 ml. de destilado titulables, se tuvo en cuenta que el A. aerogenes produce alrededor de 50 a 60 mg. % de acetoína en las fermentaciones comunes, es decir, que hay 12 mg. de AMC en los 20 ml. de líquido fermentado que se van a destilar, y aproximadamente 3 mg. en la porción titulable. Recordando que por cada ml. de iodo 0,1 N usado en la reacción del iodoformo hay 1,467 mg. de AMC, a los 3 mg. corresponden 2 ml. de iodo 0,1 N ó 1 ml. de iodo 0,2 N. Si consideramos un exceso de un 25 %, y deseamos agregar 5 ml. de iodo, deberemos usar una concentración 0,05 N, es decir, que diluimos el iodo 4 veces. Correspondientemente deberemos diluir el $S_2O_3Na_2$ cuatro ve-

ces, o sea que usaremos S2O3Na2 0,025 N en vez de 0,1 N.

Para alcalinizar hemos usado 5 ml. de HONa N, y 5,5 ml. de SO4H2 N para acidificar antes de titular.

Se comparó luego el porcentaje de destilación del AMC en esta técnica usando cantidades conocidas de acetoína. Los resultados obtenidos figuran en el cuadro VII:

Cuadro VII.			
Fracción destilada %	AMC destilado (según Langlykke y Peterson) %	Valores obtenidos %	
0 - 25	31,8	32,7	32,9
25 - 50	27,9	27,5	27,8
50 - 75	23,9	25,9	24,8

Se observan algunas diferencias en la cantidad de AMC que pasa en el primer cuarto y en el tercero. Como éste es el que más nos interesa, por ser el empleado en la titulación, repetimos los ensayos de destilación para determinar el porciento de AMC que pasa en la porción a analizar, empleando cantidades conocidas de acetoína.

En el cuadro VIII hacemos constar el porciento de AMC que ha destilado en el tercer cuarto en una serie de determinaciones, y además hemos calculado la cantidad de acetoína que contiene la muestra de 20 ml., utilizando el factor 0,239 que emplean Langlykke y Peterson, y el de 0,253 que

AMC en 20 ml de muestra mg.	AMC hallado en el tercer cuarto mg.	AMC destilado en el tercer cuarto %	Factor 0,239		Factor 0,211	
			AMC en 20 ml de muestra mg	Error %	AMC en 20 ml de muestra mg.	Error %
4,38	1,09	24,9	4,56	+ 4,1	4,3	- 1,8
4,38	1,10	25,1	4,6	+ 4,9	4,35	- 0,7
5,05	1,25	24,8	5,23	+ 3,8	4,94	- 2,2
7,15	1,85	25,9	7,74	+ 8,4	7,32	+ 2,4
7,87	1,87	23,8	7,85	- 0,2	7,41	- 5,8
7,87	2,01	25,5	8,4	+ 2,8	7,94	— 0,9
8,8	2,24	25,5	9,37	+ 6,8	8,85	+ 0,6
9,3	2,37	25,5	9,9	+ 6,8	9,36	+ 0,6
3,84	0,91	23,7	3,81	- 0,8	3,4	- 11,4
3,84	1,015	26,4	4,25	+ 10,7	4,01	+ 4,4
	Promedio	25,3				

Cuadro VIII

daría el promedio de los resultados hallados en nuestro primer ensayo. Hemos tabulado también los errores que se cometen al considerar uno u otro de los factores de cálculo.

Se observa que el promedio de los valores de AMC % que destila en el tercer cuarto es 25,3 %, que coincide con el encontrado en nuestro primer ensayo. Se comprueba también que, salvo en un caso, el error no supera al 5 %, mientras que utilizando el factor 0,239, los errores son un poco mayores.

Al efectuar la destilación directa de los líquidos fermentados por A. aerogenes nos encontramos con una dificultad práctica: una enorme tendencia a dar espuma. Ensayamos primero el uso de unas gotas de alcohol octílico, sin mayor éxito. Tratamos luego de subsanar este inconveniente aplicando la técnica de Folin y Wu para precipitar proteínas con ácido túngstico. Obtuvimos un precipitado de tipo coloidal, que seguía dando espuma. Aprovechamos entonces una sugestión de Paretsky y Werkman ("Arch. Biochem.", 14, 11-16, 1947) y se ensayó la precipitación de las células con ácido fosfotúngstico al 20 %. Se observó así que después de filtrar el precipitado formado, la destilación no ofrecía inconvenientes.

Como la filtración del precipitado resultaba demasiado lenta, se procedió a centrifugarlo, con lo que en corto

espacio de tiempo se obtiene un líquido que destila sin mayores dificultades.

Ensayamos entonces la posible influencia que la introducción del ácido fosfotúngstico produce en el contenido de acetoína revelable. Para ello se ensayó el porciento de AMC que pasa en el tercer cuarto, empleando soluciones conocidas de acetoína previamente tratadas con ácido fosfotúngstico. El AMC se agregó en algunos casos a medio de cultivo no fermentado, y en otros se utilizó como base para el agregado de acetoína, el líquido fermentado en que el AMC hubiera ya desaparecido.

En el cuadro IX hacemos constar análogamente el porciento de AMC que pasa en el tercer cuarto y hemos calculado también la cantidad de AMC que contienen los 20 ml. de muestra utilizando el factor 0,239 de Langlykke y Peterson, y el factor 0,211, promedio de los porcentajes de destilación hallados. Nuevamente hemos encontrado los errores cometidos al considerar uno u otro de los factores de cálculo.

Se observa que los errores cometidos considerando el factor 0,211 son inferiores al 10 %, mientras que en el otro caso exceden dicho valor. Es decir, que la introducción del ácido fosfotúngstico modifica el porciento de AMC que destila en el tercer cuarto.

AMC en 20ml de muestra mg.	AMC hallado en el tercer cuarto mg.	AMC destilado en el tercer cuarto %	Factor 0,239		Factor 0,21[illegible]	
			AMC en 20 ml de muestra mg.	Error %	AMC en 20 ml de muestra mg.	Error %
3,41	0,66	19,3	2,78	- 18,5	3,11	- 8,8
7,7	1,66	21,5	6,95	- 9,7	7,83	+ 1,7
7,7	1,77	23	7,4	- 3,9	8,35	+ 8,4
4,4	0,97	22,1	3,91	-11,1	4,6	+ 4,5
3,96	0,84	21,1	3,5	- 11,6	3,94	- 0,5
3,54	0,741	21	3,1	- 12,4	3,5	- 1,1
3,54	0,76	21,4	3,16	- 7,9	3,56	+ 0,6
3,54	0,71	20	2,97	- 16	3,34	- 5,6
	Promedio	21,1				

Cuadro IX.- Destilación con agregado de ácido fosfotúngstico.

Adoptamos por consiguiente los factores 0,253 y 0,211 para el caso de destilación sin y con agregado de ácido fosfotúngstico, respectivamente, en vez de 0,239 del método de Langlykke y Peterson.

El cálculo para determinar la cantidad de AMC presente en la muestra debe ser modificado teniendo en cuenta que por cada ml. de iodo 0,025 N hay 0,367 mg. de AMC en los 20 ml. de muestra. Recordando además los factores 0,253 y 0,211 hallados tenemos:

$$\text{mg. de AMC en 100 ml.} = \frac{0{,}367 \times \Delta \text{ml. } S_2O_3Na_2}{0{,}253} \cdot \frac{100}{20}$$

Si se utiliza la precipitación con ácido fosfotúngstico:

$$\text{mg. de AMC en 100 ml.} = \frac{0{,}367 \times \Delta \text{ml. } S_2O_3Na_2}{0{,}211} \cdot \frac{100}{20}$$

La destilación usando 20 ml. de muestra fué la adoptada para estudiar la variación del contenido de acetoína cuantitativamente, en distintas condiciones.

5) Ensayo de crecimiento de distintas bacterias en medios con AMC como única fuente de carbono.

Habiendo observado en los ensayos anteriores la interesante propiedad que poseen algunas cepas de A. aerogenes de "destruir" el AMC que ellas producen, se trató de probar el comportamiento de las mismas y de otras bacterias, en medios con AMC.

Para ello nos basamos en el trabajo de Tittsler (1938), utilizando el mismo medio sintético con AMC como única fuente de carbono, pero con distintas concentraciones de acetoína: 0,2 %, 0,1 %, 0,05 % y 0,02 %. Se empleó además el medio con agregado de 0,5 % de glucosa, y con glucosa 0,5 % y AMC 0,02 %.

Se hicieron controles con soluciones análogas de AMC en agua y en caldo extracto de carne, y con medio sintético, agua y caldo sin AMC.

Tratamos de comprobar la opinión de Tittsler, y también la de Tomiyasu (1938), que ensayaron sobre el grupo coliforme, de que sólo las cepas que hacen desaparecer una V-P positiva son capaces de crecer en un medio sintético con acetoína como única fuente de C, y que las del grupo coli, no productoras, tampoco utilizan el AMC.

Se realizó este ensayo sobre 2 bacterias productoras:

A. aerogenes y B. polymyxa, y 2 no productoras de AMC: E. coli y B. macerans, y se utilizó además otra temperatura de incubación para el grupo coliforme: 28º, la óptima de crecimiento y de producción de acetoína, en vez de 37º, que empleara Tittsler.

En todos los casos se partió de cultivos en agar de 24 horas, lavando y centrifugando las cepas antes de usarlas. Se sembró 1 ansa de una suspensión espesa de dichas bacterias así tratadas en unos 2 ml. de medio.

Se examinaron diariamente los cultivos durante 10 días para observar crecimiento y al cabo de este tiempo se ensayó en todos la presencia de AMC.

Aerobacter aerogenes:

Se ensayaron 6 cepas, que se incubaron a 28º.

Todas las cepas desarrollaron perfectamente en todos los medios con caldo, como asimismo en los medios sintéticos con glucosa (sola y con AMC), ya a las 14 horas de incubación. En el medio sintético se observó un abundante crecimiento con todas las concentraciones de AMC ensayadas, a las 48 horas, en sólo 2 cepas, la 14 y la 15 ("destructoras" por los ensayos previos). Las demás cepas, no "destructoras", no desarrollaron en el medio sintético con AMC como única fuente de C. En los controles con agua no se observó crecimiento.

Cuadro X.					
Medio	Desarrollo		AMC (límite)		
	Cepa 14	Cepa 15	Cepa 14	Cepa 15	Control
Sint.+0,2% AMC	++	++++	10	±	500
Sint.+0,1% AMC	++++	++++	-	-	300
Sint.+0,05% AMC	++++	++++	-	-	150
Sint.+0,02% AMC	++++	++++	-	-	70
Sint.+0,5% gl.	++++	++++	±	-	-
Sint.+0,5% gl.+0,02% AMC	++++	++++	5	-	70
Caldo+0,2% AMC	++++	++++	-	-	700
Caldo+0,1% AMC	++++	++++	-	-	400
Caldo+0,05% AMC	++++	++++	-	-	200
Caldo+0,02% AMC	++++	++++	-	-	100
Caldo+0,5% gl.	++++	++++	-	-	-
Caldo+0,5% gl.+0,02% AMC	++++	++++	5	-	100

Al cabo de 10 días se ensayó la presencia de AMC en cada uno de los medios empleados, por diluciones crecientes, considerándose como límite la mayor dilución que da reacción positiva con la técnica de Coblentz. En el cuadro figura el denominador de dicha dilución límite.

Se encontró desaparición total de la acetoína en concentración inferior al 0,2 % en el medio sintético para las cepas 14 y 15. Con 0,2 % la desaparición de AMC no fué total,

quedando un residuo algo mayor en la 14, coincidente con un desarrollo un poco inferior. En los medios con caldo hubo destrucción total de acetoína.

En las demás cepas, que no desarrollaron en el medio sintético con ninguna concentración de AMC, tampoco hubo desaparición de acetoína en los medios con caldo.

Bacillus polymyxa:

Se ensayaron 5 cepas.

Las suspensiones se prepararon a partir de cultivos en agar rojo neutro y se incubaron a 37º.

En el medio sintético con AMC como única fuente de carbono no creció ninguna de las cepas ensayadas. En cambio hubo un desarrollo progresivo en el medio sintético con agregado de glucosa (sola y con AMC) y en los medios de caldo con acetoína, y con glucosa (sola y con AMC).

En los medios con agua no hubo desarrollo.

Practicada la reacción de la acetoína al cabo de 10 días, se comprobó que en ninguno de los medios hubo utilización de AMC.

Escherichia coli:

Se ensayó con coli I, intermediario I y II e irregular I y VII. Se incubó a 28º.

No hubo crecimiento en el medio sintético con acetoína como única fuente de carbono, en ninguna de las cepas. Desarrollaron abundantemente los controles de dicho medio con glucosa (sola y con acetoína), y los controles de caldo con todas las concentraciones de AMC.

En ningún caso hubo utilización de AMC.

Bacillus macerans:

Se ensayaron 5 cepas, que se incubaron a 37º.

Se observó desarrollo en el medio sintético con glucosa, y un poco mayor en el de glucosa y AMC, pero no hubo crecimiento con ninguna concentración de AMC como única fuente de carbono.

Todas las cepas crecieron en los medios con caldo, con todas las concentraciones de AMC.

En los controles con agua no hubo crecimiento.

Cuadro XI.					
Medio: Sintético + 0,5% gluc + 0,02% AMC					
AMC (dilución límite)					
Control	Cepa				
	436	3-21	432	433	172
70	5	15	15	15	30

Al ensayar la presencia de AMC, se observó un aprove-

chamiento del mismo, variable para las distintas cepas, en el medio sintético con glucosa y AMC (cuadro XI).

En los medios con caldo no hubo utilización de acetoína por ninguna cepa.

Es decir, que sólo en el medio más pobre en carbono, como es el sintético, fué aprovechado el AMC.

Se comprueba nuevamente lo ya afirmado por Tittsler y Tomiyasu de que sólo las cepas productoras de AMC que hacen desaparecer una V-P positiva son capaces de crecer en un medio sintético con acetoína como única fuente de carbono. El B. macerans, no productor de AMC, fué capaz de aprovechar el AMC en un medio pobre en C, pero no creció en el medio sintético con acetoína como única fuente de C.

Se observa además que en concentraciones de hasta 0,2% (máxima ensayada), el AMC no produce modificaciones en el cultivo en medio líquido en A. aerogenes, E. coli, B. macerans y B. polymyxa.

Se ensayó también la acción bacteriostática de la acetoína sobre E. coli y A. aerogenes. Para ello, a partir de un cultivo de 24 horas en agar, se hizo una suspensión en 1 ml. de solución fisiológica estéril. De dicha suspensión se sembró 1 ansa en 1 ml. de solución fisiológica con distintas concentraciones de AMC: 0,1 %, 0,3 % y 1 %. Se sembró

además en solución fisiológica sola, como control. De estos tubos se hicieron estrías en placas de agar común a los 0, 5, 30 y 60 minutos y éstas se incubaron a 28º durante 24 horas, no observándose diferencias en el crecimiento entre el control y las otras suspensiones.

Es decir, que el AHC en concentración de hasta 1 % no tiene acción bacteriostática sobre A. aerogenes (las 6 cepas ensayadas) y E. coli y miembros del grupo irregular e intermediario (5 cepas).

6) Estudio de las condiciones de "desaparición" de AMC con ciertas cepas de A. aerogenes.

Finalmente se estudiaron las condiciones en que el AMC "desaparece" de los cultivos de ciertas cepas de A. aerogenes, ensayando la influencia que pudieran tener el medio de cultivo, los factores de óxido-reducción, la aereación y la temperatura de incubación, para determinar las condiciones favorables u óptimas de formación y permanencia del AMC en los cultivos.

Medio de cultivo:

Se ensayó la influencia que pudiera tener el medio de cultivo comparando medios muy diferentes como son el de Clark Lubs, medio peptonado rico en carbono, y un medio sintético con glucosa como única fuente de carbono.

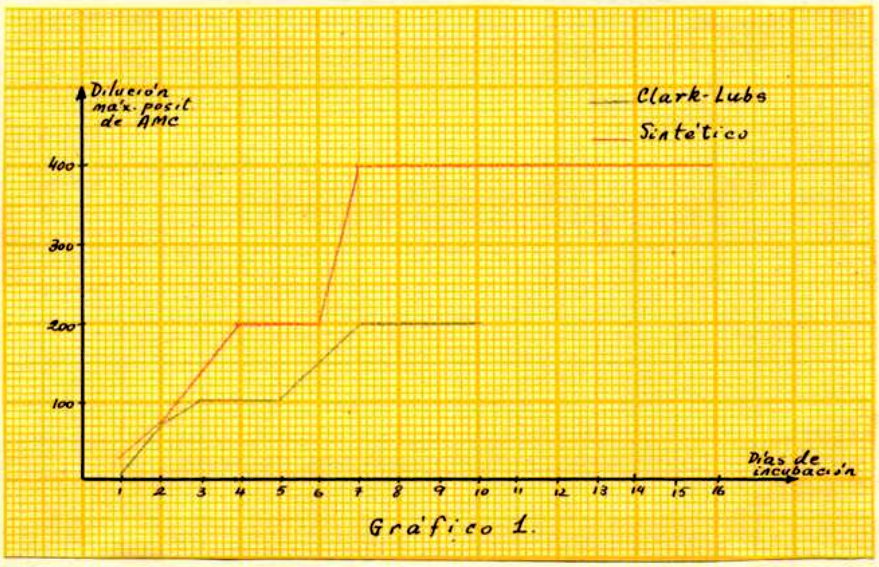
En esta comparación se realizaron las experiencias en tubos de ensayo, que se incubaron a 28º, usándose 5 cepas de A. aerogenes, 2 de las cuales eran "destructoras".

Para tener una idea semicuantitativa de la variación del contenido en AMC, se sacó diariamente muestra y se hicieron diluciones crecientes con el medio ensayado, considerándose como límite la mayor dilución que daba reacción positiva de AMC por la técnica de Coblentz. En los cuadros figura el denominador de dicha dilución.

Se han llevado en cada caso los resultados obtenidos a un gráfico en que se compara, para la misma cepa, la variación de AMC con el tiempo de incubación, para los 2 medios ensayados.

Cepa 1 (cuadro XII, gráfico 1).

Cuadro XII													
AMC (dilución máxima positiva)													
Medio	Tiempo de incubación (días)												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	14	16
C-Lubs	10	75	100	100	100		200	200		200			
Sint.	30	75		200	200	200	400		400		400	400	400



Cepa 2-9 (cuadro XIII, gráfico 2).

Cuadro XIII.													
AMC (dilución máxima positiva)													
Medio	Tiempo de incubación (días)												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	14	16
C-Lubs	10	75	100	100	100		150	200		200			
Sintét.	1	50		100	100	200	200		200		200	200	200

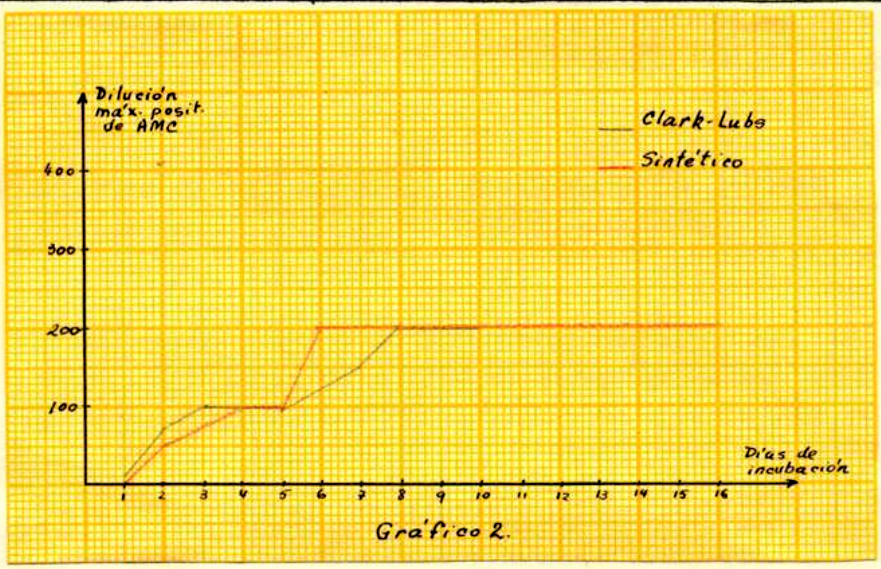


Gráfico 2.

Cepa 9-1 (cuadro XIV, gráfico 3).

Cuadro XIV.							
AMC (dilución máxima positiva)							
Medio	Tiempo de incubación (días)						
	1	2	7	8	9	10	16
Clark-Lubs	10	100	100	100		200	200
Sintético	10	50	50		100	100	100

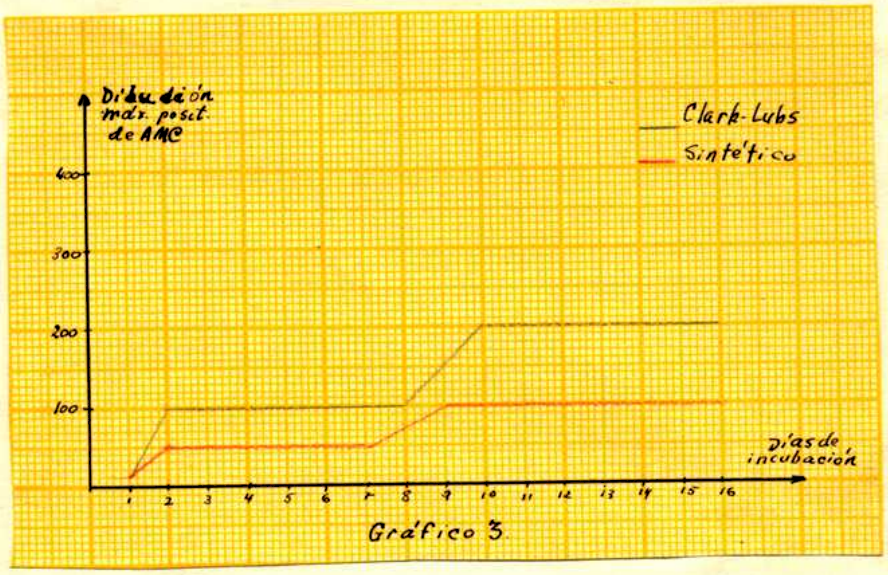


Gráfico 3.

Cepa 14 (cuadro XV, gráfico 4).

Cuadro XV.													
AMC (dilución máxima positiva)													
Medio	Tiempo de incubación (días)												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	14	16
C-Lubs	30	100	50	50	50		30	5		-			
Sintét.	30	75		50	50	30	30		30		30	10	-

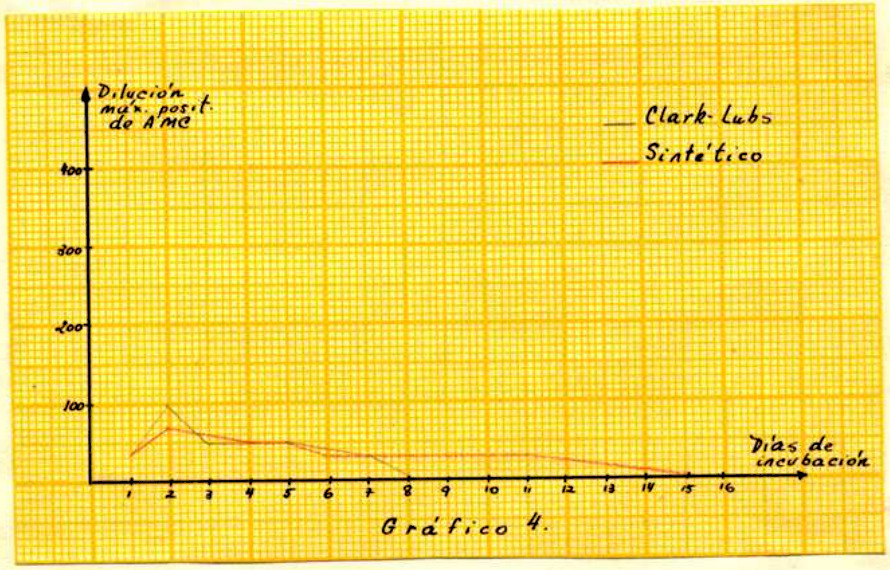
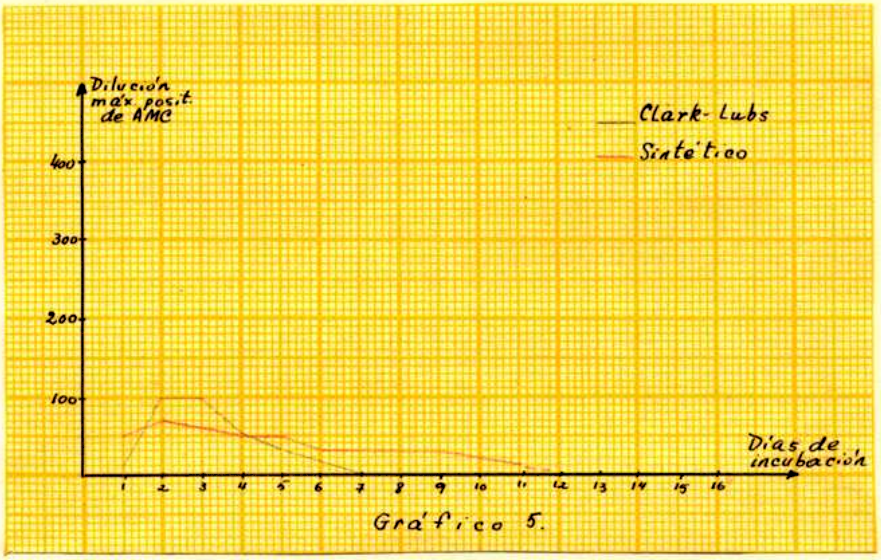


Gráfico 4.

Cepa 15 (cuadro XVI, gráfico 5).

Cuadro XVI.										
AMC (dilución máxima positiva)										
Medio	Tiempo de incubación (días)									
	1	2	3	4	5	6	7	9	11	14
Clark-Lubs	10	100	100	50	30		-			
Sintético	50	75		50	50	30	30	30	10	-



De la observación de los gráficos se deduce que para las cepas no "destructoras" ensayadas, no hay una diferencia muy grande en la producción de AMC entre el medio de Clark-Lubs y el sintético con glucosa, siendo en general mejor la producción para el sintético.

Se encuentra además para las mismas cepas no "destructoras" un fenómeno que se repite en todas ellas: la produc-

ción de 2 mesetas en la curva ascendente de formación de AMC, situadas a intervalos algo diferentes en cada una. Este hecho se observa en ambos medios ensayados.

Para las cepas "destructoras" se encuentra una producción máxima de AMC algo menor con el medio sintético que con el de Clark-Lubs, alrededor del tercer día, siendo la desaparición más lenta para el medio sintético.

Se siguió por otra parte, por medición cuantitativa, la variación de AMC en el medio de Clark-Lubs, y en el de O'Meara, medio más pobre en C, pero con ácido fumárico, importante factor de óxido-reducción. Se ensayaron 3 cepas de A. aerogenes, 2 "destructoras" y 1 no "destructora".

Para estas experiencias se preparó un "inoculum" sembrando 1 ansa de un cultivo en agar de 24 horas, en 25 ml. de medio, que se incubó a 28º durante 24 horas. De éste se inoculó al 3 % en 400 ml. de medio contenidos en un Erlenmeyer de 1 litro, para asegurar una buena aereación, y se incubó nuevamente a 28º. Diariamente se sacaron 20 ml. de muestra, que se dosaron con el método volumétrico modificado, previa precipitación de las células con ácido fosfotúngstico. El "inoculum" en medio de Clark-Lubs se utilizó para sembrar en el mismo medio y en el de O'Meara, y viceversa, para ver la posible influencia del cambio de medio.

Nuevamente hacemos constar en gráfico la variación del contenido de AMC con el tiempo de incubación.

Cepa 15

"Inoculum" en medio de Clark-Lubs (cuadro XVII, gráf. 6).

Cuadro XVII.											
Contenido en AMC (mg. %)											
Medio	Tiempo de incubación (días)										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	11
C-Lubs	0,7	21,2	38,5	34,4	10,7	9,1	1,1	0			
O'Meara	0,7	7,8	17,5	35,8	42,2	36,4		15,2	10,2	10,1	0,2

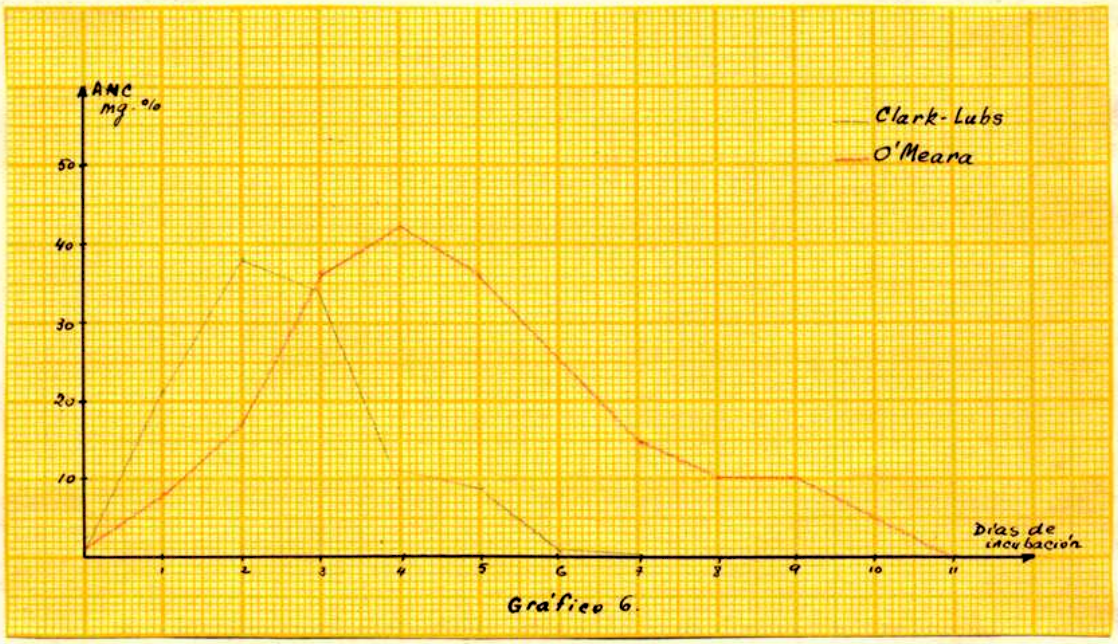


Gráfico 6.

Cepa 14

"Inoculum" en medio de O'Meara (cuadro XVIII, gráf. 7).

Cuadro XVIII.												
Contenido de AMC (mg. %)												
Medio	Tiempo de incubación (días)											
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	11	12
Clark-Lubs	3,2	20,1	29,1	20,1	8,7	3,7	2,4		1,9		0	
O'Meara	3,2	39,3		18,7		8,7	3,8	3,2	2,7	2,7		0

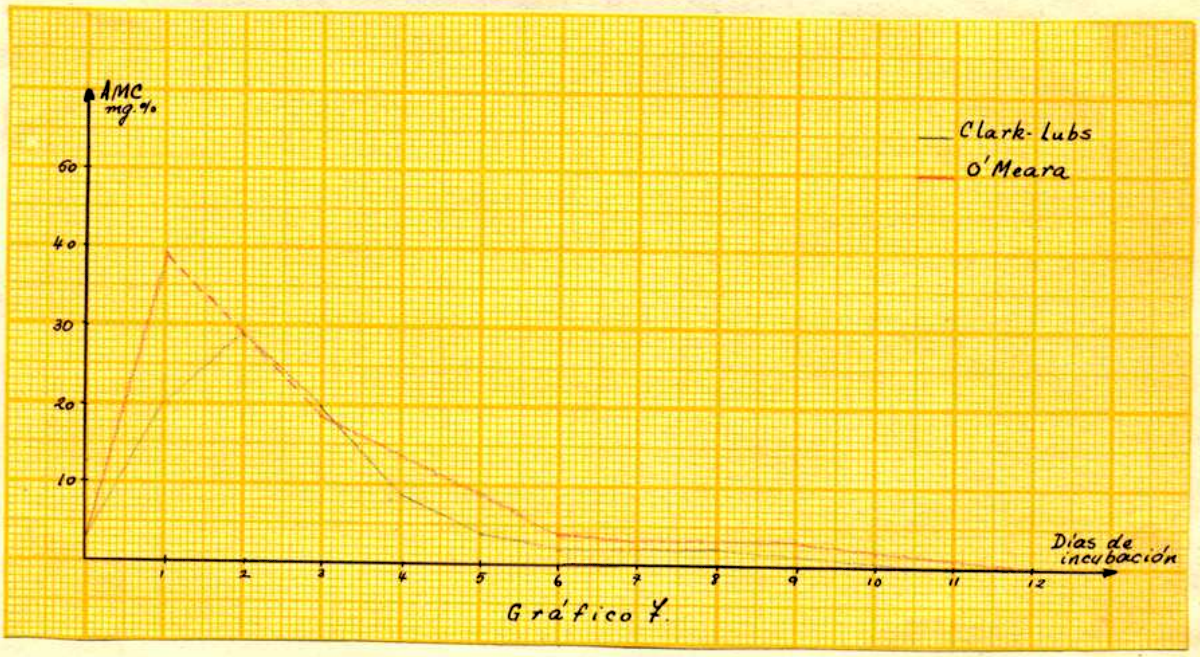


Gráfico 7.

Cepa 2-9

"Inoculum" en medio de O'Meara (cuadro XIX, gráf. 8).

Cuadro XIX.								
Contenido de AMC (mg. %)								
Medio	Tiempo de incubación (días)							
	0	1	2	4	5	6	7	9
Clark-Lubs	1,3	2,7	4	5	4,8	7,2	7,7	7,9
O'Meara	1,3		21,1	28,7	36,3	44,4	51,5	74,7

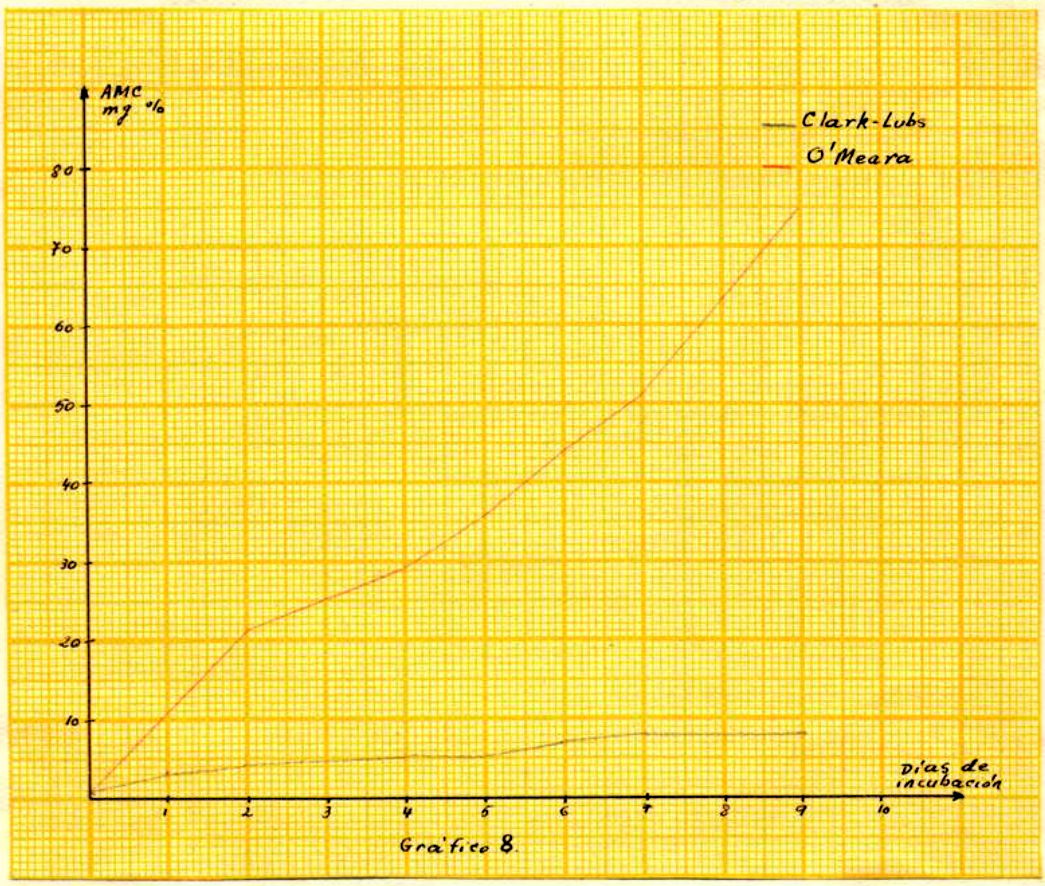


Gráfico 8.

Observando los gráficos se nota en todos los casos una producción mayor de AMC en el medio de O'Meara. Esta diferencia resulta mucho más notable en el caso de la cepa 2-9, no "destructora", en la que también se encuentran las 2 mesetas en la curva de formación de acetoína.

Para las cepas "destructoras" se ve un máximo algo mayor y una desaparición más lenta con el medio de O'Meara. Se encuentra además que cuando se utiliza un "inoculum" en un medio para sembrar en otro distinto, hay un cierto retardo en la producción del máximo de AMC, si se lo compara con el pasaje al mismo medio del "inoculum".

Se observa también, en el caso de las cepas "destructoras", que en todos los medios ensayados, la curva de formación y "destrucción" de acetoína no es simétrica, sino que presenta un descenso más suave antes de desaparecer totalmente.

Ácido fumárico:

Viendo que el medio de O'Meara resultaba el más apropiado en cuanto a producción y permanencia del AMC en los cultivos, se estudió la influencia del ácido fumárico, principal agente de óxido-reducción de dicho medio, especialmente sobre las cepas "destructoras".

Se preparó así un medio con todos los componentes del

medio de O'Meara, salvo el ácido fumárico, agregando además un 0,2 % de AMC, y se comparó con el medio de O'Meara (con fumárico), tal cual y con el agregado de 0,2 % de AMC. Se ensayó con la cepa 15, "destructora" más rápida, incubando a 28º. Se sacaron muestras a intervalos para determinar la presencia de AMC por la técnica de Coblentz, considerándose como límite el momento en que se obtenía una reacción negativa ("destrucción" total).

Cuadro XX.	
"Destrucción" de AMC	
Medio	Tiempo (días)
O'Meara + fumárico	8 - 9
O'Meara - fumárico + AMC	13
O'Meara + fumárico + AMC	> 23

Se ve el efecto retardador del ácido fumárico sobre la desaparición del AMC agregado, y la rápida "destrucción" del AMC producido por el mismo microorganismo, debido a que la cantidad de acetoína en este caso es menor.

Temperatura de incubación:

Se ensayó también el efecto del ácido fumárico a distintas temperaturas de incubación: 28º, la temperatura aconsejada actualmente para la producción de AMC, y 37º, la uti-

lizada anteriormente.

Se ensayaron 2 cepas, la 14 y la 15, y se sacaron muestras nuevamente para determinar el momento de la desaparición total de AMC.

Los resultados obtenidos figuran en el cuadro XXI:

Cuadro XXI.			
Tiempo de desaparición de AMC (días)			
Cepa	Medio	Temp. de incubación	
		28º	37º
14	O'Meara - fumárico + AMC	<6	<6
	O'Meara + fumárico + AMC	>11	>6
15	O'Meara - fumárico + AMC	>11	>6
	O'Meara + fumárico + AMC	>24	15

Se confirma en este caso el efecto retardador del ácido fumárico sobre la desaparición de AMC y observamos además que la "destrucción" de acetoína es más lenta a 28º, temperatura óptima de crecimiento de A. aerogenes y de producción de AMC, que a 37º.

Dado que el medio sintético con glucosa empleado en las experiencias anteriores difiere principalmente del de O'Meara por la falta de citrato de sodio y ácido fumárico, se compararon ambos medios, para ver la influencia de este factor.

Se ensayaron ambos medios sin modificar, con agregado de AMC y con AMC pero sin glucosa. Se agregó en esta experiencia una cantidad menor de acetoína: 0,05 % en vez de 0,2 % para acortar el tiempo de "destrucción". Se ensayó sobre las 2 cepas "destructoras" 14 y 15, incubando en cada caso a 28º y a 37º. La lista de los medios empleados resulta entonces:

Medio sintético con glucosa = S g.

Medio de O'Meara = O g f.

Medio sintético + AMC = S g A.

Medio de O'Meara + AMC = O g f A.

Medio sintético + AMC, sin glucosa = S A.

Medio de O Meara + AMC, sin glucosa = O f A.

Se sacaron muestras a intervalos para determinar el momento de la "destrucción" total de AMC.

Los resultados obtenidos figuran en el cuadro XXII.

Se observa en dicho cuadro que cuando falta la glucosa la "destrucción" del AMC agregado es más rápida, probablemente porque la cantidad de éste es menor, ya que falta la acetoína proveniente del hidrato de carbono. En el medio sintético, en que la única fuente de carbono es el AMC, éste es "destruído" antes que en el medio de O'Meara sin glucosa, que contiene fumárico y citrato de sodio como fuentes de carbono.

Se confirma por otra parte que la desaparición de AMC

Cuadro XXII.			
Tiempo de desaparición de AMC (días)			
Cepa	Medio	Temperatura de incubación	
		28º	37º
14	O g f	Entre 8 y 12	8
	S g	8	3
	O g f A	15	Entre 8 y 12
	S g A	8	Entre 3 y 8
	O f A	<3	<3
	S A	<3	<3
15	O g f	12	Entre 3 y 8
	S g	Entre 3 y 8	<3
	O g f A	>19	19
	S g A	12	Entre 3 y 8
	O f A	Entre 3 y 8	3
	S A	3	<3

tiene lugar más rápidamente a 37º, y que el ácido fumárico retarda la "destrucción".

Aereación:

La aereación es un factor en la producción de AMC sobre cuya importancia concuerdan todos. Ensayamos entonces qué influencia puede tener en la "destrucción" de acetoína.

Para ello comparamos los resultados de fermentación en

Cuadro XXIII.			
Tiempo de desaparición de AMC (días)			
Cepa	Medio	En tubo	En Erlenmeyer
14	O g f	15	21
	S g	8	Entre 15 y 21
	O g f A	>21	>21
	S g A	4	8
	O f A	5	8
	S A	4	5
15	O g f	15	>21
	S g	3	8
	O g f A	>21	>21
	S g A	8	14
	O f A	5	14
	S A	4	7

los medios empleados en el ensayo anterior, contenidos en tubos de ensayo comunes, con 10 ml. de medio, en un caso (mucha profundidad y poca aereación), y en Erlenmeyer de 50 ml. también con 10 ml. de medio (poca profundidad y máxima aereación). Se ensayaron las cepas 14 y 15 que se incubaron a 37º para acortar el tiempo de "destrucción" de AMC. También en este caso hemos determinado el momento de desaparición total de la acetoína (cuadro XXIII).

Resulta entonces evidente que la aereación retarda notablemente la "destrucción" de AMC.

Del conjunto de estas experiencias se deduce que el medio más favorable para la producción y permanencia del AMC en los cultivos, a juzgar por los resultados obtenidos con las cepas "destructoras" de A. aerogenes, es el de O'Meara, que contiene ácido fumárico, factor de óxido-reducción sumamente importante.

Se constata también que la temperatura de incubación más conveniente es la de 28º, y que en cultivos de mucha superficie y poca profundidad (máxima aereación), la "destrucción" es más lenta, de tal modo que la substancia formada en los primeros momentos no desaparece cuando se prolonga la fermentación.

CAPÍTULO V

RESUMEN Y CONCLUSIONES

1º.- Se examinan los métodos cualitativos más importantes de determinación de acetoína, comparando sus ventajas e inconvenientes y se determina el límite de sensibilidad de cada uno de ellos. Como consecuencia, se prefiere la técnica de Coblentz, con alfa-naftol y creatina, por su alta sensibilidad, porque es sencilla de ejecutar, rápida en desarrollar, neta y aplicable aún en medios de cultivo no peptonados.

2º.- Se aplican las técnicas analizadas anteriormente para determinar la presencia de AMC durante el curso de una fermentación, con distintas cepas de A. aerogenes, y utilizando diferentes medios de cultivo y temperaturas de incubación. En todos los casos, la técnica de Coblentz une a las ventajas ya enunciadas, la de servir mejor para apreciar la variación del contenido de AMC en el curso de una fermentación.

3º.- Se ensaya el método volumétrico de Langlykke y Peterson para la determinación cuantitativa de acetoína, obte-

niéndose, con mayor rapidez y sencillez de ejecución, un rendimiento comparable al de la mejor técnica gravimétrica.

4º.- Se modifica la técnica de Langlykke y Peterson de modo de utilizar sólo 20 ml. de líquido fermentado, variando la concentración de los reactivos, y se aconseja el uso de un factor de destilación distinto del empleado para la determinación con mayor cantidad de muestra.

Se trata de subsanar el gran inconveniente de la producción de espuma cuando destilan líquidos fermentados por A. aerogenes, precipitando las células con ácido fosfotúngstico al 20 %, el cual introduce un factor de destilación también distinto.

5º.- Se ensaya el comportamiento de 2 bacterias productoras de AMC, A. aerogenes y B. polymyxa, y 2 no productoras: E. coli y B. macerans, en medios con acetoína, utilizando una temperatura de incubación distinta de la que registra la literatura.

Se confirma la opinión de Tittsler y de Tomiyasu de que sólo las cepas productoras de AMC hacen desaparecer una V-P positiva son capaces de crecer en un medio sintético con AMC como única fuente de C. El B. macerans, no productor de AMC, fué capaz de aprovechar la acetoína en un medio pobre en C,

pero no creció en el medio sintético con AMC como única fuente de C. Se observa en todos los casos que la cepa desempeña un papel muy importante.

Se encuentra también que en concentración de hasta 0,2 % (máxima ensayada), el AMC no produce modificaciones en el cultivo en medio líquido en A. aerogenes, E. coli, B. macerans y B. polymyxa.

Se ensayó además la acción bacteriostática del AMC sobre A. aerogenes, E. coli y miembros del grupo irregular e intermediario, observándose que en concentración de hasta 1 % no tiene acción sobre las cepas ensayadas.

6º.- Se estudiaron finalmente las condiciones de desaparición de AMC con ciertas cepas de A. aerogenes, ensayando la influencia del medio de cultivo, factores de óxido-reducción, temperatura de incubación y aereación. De resultas de ello se encuentra que el medio más favorable para la formación y permanencia del AMC es el de O'Meara, que contiene ácido fumárico, factor de óxido-reducción muy importante.

Con las cepas "destructoras" de A. aerogenes, el máximo de producción de AMC se encuentra entre el 2º y 4º día, por lo cual no conviene ensayar la formación de acetoína después del 3º día, según aconsejaran las investigaciones más recientes.

Se constata también una desaparición de AMC más lenta utilizando una temperatura de incubación de 28º (óptima de producción de AMC y de crecimiento de A. aerogenes), y el cultivo con mucha superficie y poca profundidad (máxima aereación).

De acuerdo con estos resultados se aconsejan las mejores condiciones para la producción e investigación del AMC: siembra en medio de O'Meara, utilizando cultivos con mucha superficie y poca profundidad (p. ej. 10 ml. de cultivo en Erlenmeyer de 50 ml.), incubación a 28º y determinación de la presencia de acetoína entre el 2º y 3º día, con la técnica de Coblentz (alfa-naftol y creatina).

B I B L I O G R A F Í A

American Public Health Association, Laboratory Section. Standard Methods for the Examination of Water and Sewage, 1933, 1936.

Barritt, Maxwell. Intensification of the Voges-Proskauer reaction by the addition of alpha-naphtol. J. Path. & Bact. 42, 441 (1936).

Barritt, Maxwell. The origin of acetylmethylcarbinol in bacterial fermentations. J. Path. & Bact. 44, 679-90 (1937).

Batty-Smith, C. G. The detection of acetylmethylcarbinol in bacterial cultures. A comparative study of the methds of O'Meara and of Barritt. J. Hyg. 41, 521-29 (1941).

Coblentz, L. M. Rapid detection of the production of acetylmethylcarbinol. Am. J. Pub. Health 33, 815-17(1943).

Dorner, W., Hellinger, E. Studies on the Voges-Proskauer test. J. Bact. 29, 16-17 (1935).

Langlykke, A. F., Peterson, W. H. Determination of acetylmethylcarbinol. Effect on certain analytical procedures. Ind. Eng. Chem., Anal. Ed. 9, 163-6

(1937).

Leifson, Einar. An improved reagent for the acetylmethylcarbinol test. J. Bact. 23 353-54 (1932).

Lemoigne, Maurice, et Hooreman, Michel. Sur l'assimilation du 2-3 butanediol et de l'acétoïne par les bactéries. Compt. rend. 227, 159-61 (1948).

Levine, Max, Epstein S. S., Vaughn, R. H. Differential reactions in the colon group of bacteria. Am. J. Pub. Health 24, 505 (1934).

Olson, B. H., Johnson, M. J. The production of 2-3 butylenglycol by A. aerogenes 199. J. Bact. 55, 209(1948).

O'Meara, R. A. Q. A simple, delicate and rapid method of detecting the formation of acetylmethylcarbinol by bacteria fermenting carbohydrates. J. Path. & Bact. 34, 401-06 (1931).

Paine, Frederick S. Destruction of acetylmethylcarbinol by members of the colon-aerogenes group . J. Bact. 13, 269-74 (1927).

Paretsky, D., Werkman, C. H. Conversion of 2-3 butyleneglycol to acetylmethylcarbinol in bacterial fermentations. Arch. Biochem. 14, 11-16 (1947).

Pirot, R., Bourgain, M., Dufau-Casanabe, J. Identification de l'acétylméthylcarbinol dans les moyens de cul-

ture par l'osazone correspondant et sensibilisation de la méthode de Lemoigne. Ann. Inst. Pasteur 69 315-19 (1943).

Pirot, R., Bourgain, M., Dufau-Casanabe, J. La production de l'acétylméthylcarbinol dans les moyens de culture. Importance des facteurs d'oxyde-reduction. Ann. Inst. Pasteur 69, 317-19 (1943).

Ruchhoft, C. C., Kallas, J. G., Chinn, B., Coulter, E. W. Coli-aerogenes differentiation in water analysis. J. Bact. 22, 125 (1931).

Segal, Bernard. The utilization of acetylmethylcarbinol by Staphylococcus albus and aureus. J. Bact. 39, 747-49 (1940).

Silverman, M., Werkman, C. H. The formation of acetylmethylcarbinol from pyruvic acid by a bacterial enzyme preparation. J. Biol. Chem. 138, 35-48 (1941).

Stahly, G. L., Werkman, C. H. Determination of acetylmethylcarbinol in fermentation liquors. Iowa St. Coll. J. Sc. 10, 205 (1936).

Stahly, G. L., Werkman, C. H. Origin and relationship of acetylmethylcarbinol to 2-3 butyleneglycol in bacterial fermentation. Biochem. J. 36, 575-81 (1942).

Taylor, C. B. The effect of temperature of incubation on the

results of tests for differentiating species of coliform bacteria. J. Hyg. 44, 109-115 (1945).

Tittsler, Ralph P. Fermentation of acetylmethylcarbinol by the Escherichia-Aerobacter group and its significance in the Voges-Proskauer reaction. J. Bact. 35, 157-62 (1938).

Tomiyasu, Yukio. Determinación de acetoína. J. Agr. Chem. Soc. Japan 13, 787-90 (1937).

Tomiyasu, Yukio. Descomposición de acetoína por microorganismos. J. Agr. Chem. Soc. Japan 14, 406-10(1938).

Tomiyasu, Yukio. Clasificación del grupo coli-aerogenes desde el punto de vista de la descomposición y producción de acetoína. J. Agr. Chem. Soc. J. 14, 642-44 (1938).

Vaughn, R., Mitchell, N. B., Levine, Max. Voges-Proskauer and methyl-red reactions in the coli-aerogenes group. J. Am. Water Works Ass. 31, 993 (1939).

Werkman, C. H. An improved technic for the Voges-Proskauer test. J. Bact. 20, 121-25 (1930).

Williams, O. B., Morrow, Marie B. Bacterial destruction of acetylmethylcarbinol. J. Bact. 16, 43-8 (1928).